

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



COLONOSCOPIA VIRTUAL E DNA FECAL
ESTUDO DE VIABILIDADE COMO TESTES DE
RASTREIO DO CANCRO COLORRETAL

Celso António Rosa de Almeida e Silva

Doutoramento em Cirurgia Geral

Medicina

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



COLONOSCOPIA VIRTUAL E DNA FECAL
ESTUDO DE VIABILIDADE COMO TESTES
DE RASTREIO DO CANCRO COLORRETAL

Celso António Rosa de Almeida e Silva

Orientador Principal: Professor Doutor Henrique Bicha Castelo

Co-orientador: Professora Doutora Alexandra Rosa

Doutoramento em Cirurgia Geral

Medicina

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados

**A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da
Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 28 de Janeiro de 2014**



Os melhores RUMOS para os Cidadãos da Região



Ao Dr. Jaime Ricardo Jorge

Ao Dr. Jorge Jardim Buhler

À mãe Isaura

*A inteligência avalia-se pela capacidade das espécies
em fazerem o necessário para sobreviver*

Charles Darwin

Agradecimentos	ix
Lista de abreviaturas e siglas	xii
Lista de Figuras	xv
Lista de Quadros	xvi
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Anexos	xviii
Resumo	xix
Abstract	xxi
Resumé	xxiii
 1. Introdução	
1.1 Justificação do estudo	3
1.2 Hipótese e objetivos do estudo	9
1.3 Estruturação geral do rastreio e equipas de trabalho	10
 2. Colonoscopia virtual	
2.1 Conceito	15
2.2 Revisão da literatura	16
2.3 Material e métodos	19
2.3.1 Técnica	19
2.3.2 Garantia de qualidade	20
2.3.3 Transferência de imagens e interpretação	20
2.3.4 Colonoscopia ótica (CO)	21
2.3.5 Cruzamento das lesões	21
2.3.6 Análise estatística	22
2.4 Resultados	23
2.4.1 Caraterização da amostra	23
2.4.2 Caraterísticas por indivíduos	25
2.4.3 Caraterísticas por pólipos	28
2.5 Discussão dos resultados	31

3.	Satisfação com os exames de colonoscopia	
3.1	Introdução	37
3.2	Estudo 1 - Análise fatorial de componentes principais do questionário de satisfação com os exames de colonoscopias (ESEC)	40
3.2.1	Amostra e metodologia	40
3.2.2	Apresentação dos resultados relativos à validade	41
3.2.3	Dados relativos à precisão	44
3.3	Estudo 2 - Análise estatística de componentes principais do questionário de satisfação com os exames de colonoscopias (ESEC)	45
3.3.1	Amostra	45
3.3.2	Procedimentos	45
3.3.3	Apresentação dos resultados	45
3.3.3.1	Estatística descritiva	45
3.3.3.2	Satisfação em relação à CO e CV	48
3.3.3.3	Influência das variáveis género, idade e estatuto socioeconómico	48
3.4	Discussão dos resultados	51
4	Significado epidemiológico dos Programas de Rastreio e sua importância em Saúde Pública	
4.1	Introdução	55
4.2	Abordagem epidemiológica à avaliação dos programas de rastreio	55
4.2.1	A história natural da doença	56
4.2.2	Desenho de estudos para avaliação de rastreios	58
4.3	Avaliação da validade e fiabilidade dos testes de rastreio	59
4.4	Conclusões	66
5.	Aplicabilidade da análise molecular do DNA fecal para rastreio da patologia colorrectal esporádica	
5.1	Revisão da literatura	69
5.1.1	A genética do cancro	69
5.1.2	Marcadores genéticos em DNA fecal para rastreio do CCR	70
5.1.2.1	Mutações somáticas em <i>APC</i> , <i>B-RAF</i> , <i>K-RAS</i> e <i>TP53</i>	71
5.1.2.2	Marcador de integridade do DNA (<i>Long DNA</i>)	75

5.1.2.3 Painéis multimarcadores	75
5.2 Objetivos	77
5.3 Material e métodos	78
5.3.1 Amostragem e constituição do biobanco de DNA	78
5.3.2 Pesquisa de mutações somáticas em regiões dos genes <i>APC</i> , <i>K-RAS</i> , <i>B-RAF</i> e <i>TP53</i>	78
5.3.2.1 Amplificação de DNA por Polimerase Chain Reaction (PCR)	78
5.3.2.2 Sequenciação e análise de sequências	80
5.3.2.3 Ensaio PCR em Tempo-Real para K-RAS (c. 12 e 13) e B-RAF (c. 600)	80
5.3.3 Análise de L-DNA em amostras fecais	82
5.3.4 Análise estatística	83
5.3.5 Consulta de Bases de Dados	83
5.4 Resultados	84
5.4.1 Pesquisa de mutações somáticas em regiões gênicas de APC, K-RAS, B-RAF e TP53	84
5.4.2 Análise de L-DNA em amostras fecais	88
5.5 Discussão dos resultados	90
6. Conclusões	99
7. Referências bibliográficas	
7.1 Introdução	105
7.2 Colonoscopia virtual	113
7.3 Satisfação com os exames de colonoscopia	119
7.4 Significado epidemiológico e importância em Saúde Pública dos Programas de Rastreio	122
7.5 Aplicabilidade da análise molecular do DNA fecal para rastreio da patologia colorretal esporádica	123
Anexos	145

Agradecimentos

A realização deste projeto de investigação não teria sido possível sem a colaboração de muitas pessoas e o apoio de várias instituições, cujo contributo quero enaltecer, agradecer e sublinhar individualmente.

As primeiras palavras vão para o meio milhar de cidadãos que aceitaram participar no rastreio, decisão elevada que traduz a consciência da importância do envolvimento pessoal na investigação científica.

A conceção, a estruturação e a recolha de dados do estudo envolveu uma grande equipa multidisciplinar que durante cerca de quatro anos, mercê duma disponibilidade permanente e de uma paciência infinita, ajudou a definir, a planear e a ultrapassar todos os obstáculos até à obtenção dos resultados e à elaboração das conclusões.

Naturalmente, realço em primeiro lugar o Sr. Prof. Doutor Henrique Bicha Castelo, orientador principal desta tese, pelo entusiasmo e pelo estímulo persistentes que sempre imprimiu nas suas intervenções de orientação científica, ajudando o discípulo duma forma dedicada, a construir progressivamente a sua obra.

A aceitação da coorientação da tese pela Sr.^a Prof. Doutora Patrícia Alexandra da Silva Rosa, doutorada em Biologia Molecular, Professora Auxiliar Convidada da Unidade de Ciências Médicas da Universidade da Madeira (UMa) e colaboradora do Laboratório de Genética Humana da mesma Universidade (LGH-UMa), foi decisiva na viabilização do projeto. Após contatos infrutíferos com várias instituições universitárias e laboratórios privados nacionais, a disponibilização para a realização dos exames genéticos foi local. Com a anuência do Diretor do LGH-UMa, Sr. Prof. Doutor António Dias Brehm, um dos objetivos paralelos era também poder contribuir para a implementação técnica do teste genético de rastreio, em caso de sucesso. De grande competência profissional e com grandes qualidades pedagógicas e humanas, foi o elevado sentido da responsabilidade, a grande capacidade de trabalho e a elevada resistência às adversidades que permitiram que a Prof. Alexandra Rosa, em parceria com a Mestre Sara Gomes do LGH-UMa, infatigável companheira desde a primeira hora, tivessem a capacidade de ultrapassar inúmeros obstáculos técnicos para conduzir o doutorando à melhor e possível execução desta parte do estudo.

À Sr.^a Prof. Doutora Glória Franco, do Departamento de Psicologia da UMa, coube a difícil tarefa na condução da idealização dos questionários de avaliação da satisfação dos indivíduos

rastreados, que posteriormente foram aplicados pela sua equipa de psicólogas, Dr^{as} Cristina Jesus, Sofia Pereira, Sandra Aveiro, Ana Catarina Côrte, Cláudia Andrade e Soraia Garcês. Como Sócrates na ágora de Atenas, a Prof. Glória Franco ensinou-me algumas especificidades da sua área das ciências durante as muitas horas e semanas solitárias que trabalhámos conjuntamente no seu gabinete.

O meu amigo e colega radiologista, Dr. António Louis Rodrigues, do Núcleo de Imagem Diagnóstica, não faltou à chamada e dispôs-se efetuar as colonoscopias virtuais, com a ajuda competente dos seus técnicos. Foi através dele que conheci o Dr. Philippe Lefere, que por teleradiologia se prestou a fazer a leitura dos exames na Bélgica. Com grande experiência nesta área, além do trabalho efetuado, foi de enorme importância os ensinamentos que constantemente forneceu, quer em várias deslocações ao Funchal, quer por correio eletrónico, orientando, modelando e ajudando a interpretar os resultados. Colaborou ainda em vários trabalhos apresentados internacionalmente.

O enquadramento matemático do projeto teve a ajuda da Prof. Doutora Rita Vasconcelos, do Departamento de Matemática da UMa, cuja experiência profissional sobressai em todos os resultados estatísticos apresentados. Sempre com um sorriso nos lábios, nunca se agastou com as várias correções que foram necessárias efetuar na base de dados, obrigando a recomençar de novo todos os cálculos.

Especialista em Informática, o meu amigo Lisandro Araújo foi um elemento fundamental e incansável do grupo. Soube interpretar toda a informação que lhe fornecemos e conseguiu organizar uma Base de Dados sem falhas, facilmente interativa com os utilizadores e entre sectores, em português e em inglês, com palavras-passe personalizadas, de tal forma que só o Investigador Principal tinha acesso a todos os dados, aplicando rigorosamente os requisitos obrigatórios da Lei de Proteção de Bases de Dados.

Foram cinco os gastroenterologistas que executaram as colonoscopias óticas, exame padrão do estudo: Dr. Ricardo Teixeira, Diretor de Serviço, Dr. Henrique Morna, Dr.^a Isabel Jardim, Dr.^a Carla Andrade e Dr.^a Goreti Faria. Não se furtaram à exposição individual e profissional, nem ao esforço diário durante um ano, ao participarem com grande rigor e qualidade, num trabalho duplamente cego. Nesta tarefa quero realçar a colaboração imprescindível e competente da Sr.^a Enfermeira Odete Bacanhim e da técnica Patrícia Nóbrega.

O Dr. Francisco Henriques de Gouveia participou neste estudo com uma tripla função: é um amigo dedicado de muitos anos, que sempre soube dar força e estímulo nos momentos difíceis

que foram acontecendo; é um distinto anatomopatologista ex-Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e ex-Diretor do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central do Funchal, a quem coube a responsável tarefa do exame histológico das peças removidas; foi um importante suporte financeiro através do seu Laboratório de Anatomia Patológica e de Análises Clínicas, fornecendo as equipas de enfermeiros/as para as colheitas de sangue e muitos consumíveis necessários à colheita e ao acondicionamento dos tecidos e das fezes.

A D. Iva Marques responsabilizou-se pela formatação do texto e ao Dr. Rui Duarte da Mota Gomes Pereira coube a difícil tarefa da revisão literária dum texto técnico com as novas regras ortográficas.

Várias instituições deram um contributo muito importante: Clínica de Santa Catarina, que cedeu gratuitamente instalações apropriadas para a realização das colonoscopias óticas e dos vários inquéritos, e para a colheita de sangue e fezes; Núcleo de Imagem Diagnóstica, serviço de radiologia localizado na Clínica de Santa Catarina, onde se efetuaram as colonoscopias virtuais; LANA, Laboratório de Anatomia Patológica e de Análises Clínicas, responsável pelos estudos histológicos e pelas colheitas de sangue; Laboratório de Genética Humana da UMa, local dos estudos genéticos e moleculares; CITMA (Centro de Ciência e Tecnologia da Madeira), entidade cedente duma Bolsa de Doutoramento (Projeto nº 1080/1974), actualmente designado por ARDITI (Agência Regional para o Desenvolvimento da Investigação, Tecnologia e Inovação, presidida pelo Prof. Dr. Nuno Jardim Nunes); Secretaria Regional dos Assuntos Sociais, que através do Instituto de Administração e Saúde (IA-Saúde) suportou financeiramente grande parte do projeto.

Ao Senhor Secretário Regional dos Assuntos Sociais, Dr. Francisco Jardim Ramos, à Sr.^a Prof. Doutora Isabel Torres, Presidente do CITMA, aos Diretores e responsáveis das instituições referidas, quero expressar os meus mais profundos agradecimentos.

A todos os funcionários anónimos que, duma forma ou de outra, prestaram a sua colaboração com o estudo, expresso também a minha gratidão.

Lista de abreviaturas e siglas

AAR	-	Grupos de repetições de aminoácidos
ARDITI	-	Agência Regional para o Desenvolvimento da Investigação, Tecnologia e Inovação (info@arditi.pt)
BI/CC	-	Bilhete de Identidade/Cartão de Cidadão
c.	-	codão
c.X Y>Z (V>W),		em que X representa o número do codão (c.), Y a sequência do codão wildtype, Z a sequência do codão mutado, V o aminoácido wildtype e W o aminoácido resultante da mutação
CCR	-	cancro colorrectal
CITMA	-	Centro de Ciência e Tecnologia da Madeira
CO	-	Colonoscopia ótica
CO2	-	Dióxido de carbono
COSMIC	-	<i>Catalogue on Somatic Mutations in Cancer</i>
CS	-	Centros de Saúde
CTC	-	Colonografia por tomografia computadorizada
CV	-	Colonoscopia virtual (CV=CTC)
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
Dr./a/s	-	Doutor/a/s
ESEC	-	Escala de Satisfação dos Exames de Colonoscopias
ESGAR	-	<i>European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology</i>
Fg	-	fentogramas (fg= 10 ⁻¹⁵ g)
FMUL	-	Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
FN	-	Falsos negativos
FP	-	Falsos positivos

g.	-	genoma
H/M	-	Homens/Mulheres
HCF	-	Hospital Central do Funchal (atualmente Hospital Dr. Nélío de Mendonça)
HGD	-	Displasia de alto grau
HP	-	Pólipos hiperplásicos ou hiperplásticos
IARC	-	<i>International agency for research on cancer</i>
IA-Saúde	-	Instituto de Administração e Saúde da SRAS
Kb	-	Kilobases, 1000 pares de bases nucleotídicas
KDa	-	KiloDaltons
KMO	-	Índice Kaiser-Meyer-Olkin
LANA	-	Laboratório de Anatomia Patológica e de Análises Clínicas, Funchal
LGD	-	Displasia de baixo grau
LGH-UMa	-	Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira
LH-	-	Teste de verosimilhança negativo
LH+	-	Teste de verosimilhança positivo
LOH	-	<i>Loss of heterozygosity</i> (perda de heterozigotia)
LOVD	-	<i>Leiden Open Variation Database</i> (base de dados de variações de sequências genéticas, semelhante aos <i>LSDB-in-a-box</i> , locus-specific databases. <i>Hum Mutat</i> (2005). 26(2): 63-8
LSD	-	<i>Fisher's Least Significant Difference (post-hoc-test)</i>
MAF	-	<i>Minor allele frequency</i>
MMR	-	<i>Mismatch repair genes</i> (genes de reparação de maus emparelhamentos nucleotídicos)
mRNA	-	RNA mensageiro
mtRNA	-	RNA mitocondrial
Ng	-	nanogramas (ng= 10 ⁻⁹ g)

Lista de abreviaturas

NPV	-	Valor preditivo negativo
NR	-	Não referenciado
OMIM	-	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	-	pares de bases nucleotídicas
PPV	-	Valor preditivo positivo
RAM	-	Região Autónoma da Madeira
RNA	-	ácido ribonucleico
rRNA	-	RNA ribossomal
Sd=dp=DP	-	Desvio padrão
SESARAM, EPE	-	Serviços de Saúde da RAM
SNP	-	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SRAS	-	Secretaria Regional dos Assuntos Sociais
TC	-	Tomografia computadorizada
tRNA-	-	RNA transferência
UMa	-	Universidade da Madeira
VCTC	-	<i>Virtual Colonoscopy Teaching Center</i> , Bélgica
VN	-	Verdadeiros negativos
VP	-	Verdadeiros positivos

Lista de figuras

Figura 2.1	Distribuição dos indivíduos da amostra por género	23
Figura 2.2	Distribuição dos indivíduos da amostra por faixas etárias com intervalos de 10 anos	24
Figura 2.3	Distribuição dos indivíduos da amostra por faixas etárias com intervalos de 5 anos	24
Figura 2.4	Distribuição dos indivíduos da amostra por Concelho de Residência	24
Figura 4.1	Representação esquemática da história natural da doença e metodologia de intervenção	57
Figura 5.1	Eletroforese de produtos de amplificação para análise de DNA Longo em amostras fecais em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (80V, 40mins)	88

Lista de quadros

Quadro 1.1	<i>Guidelines do Working Group for Virtual Colonoscopy</i>	7
Quadro 1.2	Fluxograma do Projeto de Investigação	12
Quadro 2.1	Colonoscopia virtual: estudos de centros acadêmicos de excelência	16
Quadro 2.2	Sensibilidade da CV na detecção de adenocarcinoma	17
Quadro 2.3	Experiência da CV no rastreamento individual	18
Quadro 2.4	Sistema de classificação para a monitorização da qualidade da CV	20
Quadro 2.5	Fluxograma dos rastreios	25
Quadro 2.6	Avaliação da precisão da CV com intervalos a 95% de confiança	26
Quadro 2.7	Utilização da CV como método de rastreio - I Caraterísticas da CV por indivíduo	27
Quadro 2.8	Utilização da CV como método de rastreio - II Caraterísticas da CV por indivíduo	27
Quadro 2.9	Distribuição dos pólipos por segmento cólico	30
Quadro 3.1.	Itens que compõem a primeira dimensão: Satisfação com a CO	41
Quadro 3.2	Itens que compõem a segunda dimensão: Ansiedade face aos exames	42
Quadro 3.3	Itens que compõem a terceira dimensão: Satisfação com a CV	42
Quadro 3.4	Itens que compõem a quarta dimensão: Receios face aos exames	42
Quadro 3.5	Itens que compõem a quinta dimensão: Perceção da eficácia dos exames	43
Quadro 3.6	Itens retirados da escala	43

Lista de tabelas

Tabela 2.1	Comparação das características por indivíduo e por pólio da CV e da CO	29
Tabela 3.1	Valores do alpha de Cronbach das diferentes dimensões	44
Tabela 3.2	Mediana, moda, percentis e percentagens dos itens da ESEC agrupados pelas escalas	46
Tabela 3.3	Análise comparativa da satisfação com CO e CV com teste T-Student para amostras dependentes	48
Tabela 3.4	Média, desvio padrão e T-Student da satisfação com a CO ou com a CV, da ansiedade, receio e eficácia da CO e da CV, em função do género	49
Tabela 3.5	Média, desvio padrão e T-Student da satisfação com a CO ou com a CV, da ansiedade, receio e eficácia da CO e da CV, em função da idade (em anos)	49
Tabela 3.6	Média, desvio padrão e T-Student da satisfação com a CO ou com a CV, da ansiedade, receio e eficácia da CO e da CV, em função do estatuto sócio- económico	50
Tabela 4.1	Tabela de duas entradas com quatro resultados possíveis de um teste de rastreio e as variáveis que o qualificam	60
Tabela 4.2	Tabela de duas entradas para avaliação da CV em pólipos ≥ 6 mm (IC a 95%)	61
Tabela 5.1	Condições de PCR e <i>primers</i> utilizados na amplificação das regiões de interesse em <i>APC</i> , <i>K-RAS</i> , <i>B-RAF</i> e <i>TP53</i>	81
Tabela 5.2	Pesquisa de mutações somáticas em regiões dos genes <i>APC</i> , <i>K-RAS</i> , <i>B-RAF</i> e <i>TP53</i>	85
Tabela 5.3	Positividade do painel genético de acordo com a classificação histológica, localização e dimensão das lesões colorretais	87
Tabela 5.4	Positividade do marcador molecular L-DNA de acordo com as características da amostra e das lesões mais avançadas (colonoscopia ótica)	89

Lista de Anexos

1- Folha de informação ao sujeito	145
2 - Questionário de Exclusão	147
3 - Consentimento informado	149
4 - Instruções para colheita de fezes e sangue	151
5 - Instruções para a preparação cólica	153
6 - Critérios para CO adequada	163
7 - Diagnósticos de histologia	165
8 - Escala de satisfação com os exames de colonoscopias (ESEC)	169
9 - Estatuto socioeconómico (Método Graffar)	171
10 - Tabela suplementar L-DNA1	173
11 - Tabela suplementar L-DNA 2	175

Resumo

Pretendeu-se avaliar a utilização conjugada, ou isolada, da colonoscopia virtual e da detecção de DNA humano mutado nas fezes, como métodos de rastreio do carcinoma colorretal em indivíduos de risco médio, entre os 50 e os 74 anos, e o seu impacto na população. Utilizou-se uma amostra de 510 indivíduos, estatisticamente representativa da população madeirense.

Neste estudo de campo, transversal e baseado numa amostra com critérios de seleção bem definidos, a colonoscopia virtual baseada na teleradiologia provou ser eficiente. A colonoscopia virtual evidenciou um poder diagnóstico robusto com um alto grau de previsibilidade para a presença ou ausência de doença. A colonoscopia virtual diagnosticou 98,1% de indivíduos com pólipos adenomatosos ≥ 6 mm, número superior à colonoscopia ótica e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.04$).

Apesar da colonoscopia virtual já ter sido considerada precisa no rastreio do carcinoma colorretal por outros autores, este estudo, tanto quanto é do nosso conhecimento, é a primeira avaliação da sua *performance* em que a colonoscopia ótica, como método comparativo, não tem acesso prévio aos resultados da colonoscopia virtual, obtidos *a posteriori*, num centro de excelência remoto. É verdade universal que a alta sensibilidade da colonoscopia virtual é independente de aparelhagem de TC tecnologicamente muito desenvolvida. Ficou também demonstrado que a colonoscopia virtual tem grande sensibilidade para lesões 6-9 mm (98%).

Os resultados da análise do DNA humano mutado nas fezes no presente estudo têm que ser interpretados de forma muito cautelosa, tendo em conta as limitações metodológicas e o universo amostral reduzido. Estes fatores limitam a elaboração de ilações generalizadas e comprometem a sensibilidade do painel molecular, e como tal, tornaram inviável a aplicação dos testes de DNA fecal assim desenhados ao rastreio do carcinoma colorretal. A sensibilidade e a especificidade do *L-DNA* fecal na detecção de lesões avançadas ≥ 6 mm e adenocarcinomas (13,89% e 84,54%) esteve aquém do reportado internacionalmente (64% e 95%, respetivamente) (Abbaszadegan MR et al 2007), pelo que, na presente amostra, não se revelou um bom marcador molecular para rastreio de lesões cólicas. A sua capacidade de identificar lesões cólicas não se revelou associada à dimensão da lesão ou à região da sua localização. É no entanto de salientar que se verificou uma associação de *L-DNA* à detecção de lesões poliposas consideradas globalmente (28,6%), comparativamente com apenas os pólipos adenomatosos (8,9%). Além disso, observou-se uma tendência para que o *L-DNA* seja mais frequentemente detetado em indivíduos com uma maior número de lesões cólicas (38,5% vs 13,4%), sendo também significativamente mais frequente em amostras do sexo feminino com

3 a 5 lesões cólicas (62,5%, quando comparadas com 14,3% em amostras com 1 a 2 lesões). Por outro lado, a análise de DNA nas lesões cólicas biopsadas produziu resultados que se traduzem em importantes benefícios clínicos: a identificação de alterações somáticas em *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53* é um complemento do diagnóstico, fornecendo indicações para a vigilância e a seleção e racionalização da terapia farmacológica.

A aplicação de questionários de satisfação (ESEC) mostrou uma boa aceitação dos exames de colonoscopia virtual e colonoscopia ótica, mesmo que realizados no mesmo dia e sequencialmente, havendo, no entanto, uma tendência para maior satisfação com a colonoscopia virtual ($p=0.00$).

Em resumo, a colonoscopia virtual revelou-se um exame de rastreio do carcinoma colorretal bem aceite pela população, inócua e bastante fiável. Evita a remoção desnecessária de pólipos em pelo menos 70% dos indivíduos e é fácil de implementar com aparelhagem pouco sofisticada e com o benefício do uso concomitante da teleradiologia. Os bons resultados do estudo do DNA fecal obtidos em laboratórios de referência não são ainda generalizáveis. Os exames moleculares fecais não estão ainda disponíveis para uso em rastreios do carcinoma colorretal.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the use in conjunction, or in isolation, of the virtual colonoscopy test and of the detection of mutated human DNA in the stools, as screening methods of colorectal cancer in average risk individuals, between the ages of 50 and 74, and its impact on the population. A sample of 510 individuals, statistically representative of the Madeira population, was used.

In this controlled cross-sectional study, CT Colonography based on teleradiology proved to be efficient. CT Colonography was shown to have good diagnostic capability with a high degree of predictability for the presence or absence of illness. CT Colonography diagnosed 98,1% of the individuals with adenoma polyps ≥ 6 mm, number above of the same polyps detected by optical colonoscopy test and this difference was statistically significant ($p=0.04$).

Although the CT Colonography had already been considered to be precise in screening for colorectal cancer by other authors, this study, as much as we know, is the first evaluation of its performance using optical colonoscopy, as the gold standart test, without previons knowledge of CT Colonography results, obtained *a posteriori* in a remote academic centre. It was confirmed that the high sensitivity of CT Colonography is independent of the CT equipment being technologically very developed. It was also demonstrated that the CT Colonography test has great sensitivity for 6-9 mm lesions (98%).

The results of the analysis of the mutated human DNA in stools in the present study must be interpreted very cautiously, considering the methodological limitations and the small sample universe. These factors limit the elaboration of generalized inferences and compromise the sensitivity of the molecular panel, and as such, made the application of the stool DNA tests thus designed, unviable in screening for colorectal cancer. The sensitivity and the specificity of the stool L-DNA in the detection of advanced lesions ≥ 6 mm and adenocarcinomas (13,89% and 84,54%) was below that reported internationally (64% and 95%, respectively) (Abbaszadegan MR et al, 2007), and which, in the present sample did not prove to be a good molecular marker for screening of colon lesions. Its capacity to identify colon lesions was not shown to be associated to the size of the lesion nor to the region of its location. It is however worth pointing out that an association of L-DNA to the detection of all polypoid lesions was found (28,6%), compared with only adenomatous polyps (8,9%). Besides this, a tendency for L-DNA to be more frequently detected in individuals with a higher number of colon lesions (38,5% vs. 13,4%) was observed, also significantly more frequent in female samples with 3 to 5 colon lesions (62,5%, when compared with 14,3% in samples with 1 to 2 lesions). On the

other hand, analysis of the DNA in biopsied colic lesions produced results that translated into important clinical benefits: the identification of somatic alterations in *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53* are a complement to the diagnosis, providing indications for the monitoring and selection and rationalization of pharmacological therapy.

The use of satisfaction questionnaires (ESEC) indicated good acceptance of the CT Colonography and optical colonoscopy tests, even when carried out on the same day and sequentially, there being, however, a tendency for greater satisfaction with the CT Colonography ($p = 0.00$).

In summary, the CT Colonography proved to be a colorectal cancer test that is readily accepted by the population, bloodless and sufficiently reliable. It avoids the unnecessary removal of polyps in over 70% of individuals. It is easy to implement with not very sophisticated equipment and with the benefit of the concomitant use of teleradiology. The good results of the study of the fecal DNA obtained in laboratories of reference cannot yet be generalized. The stool molecular tests are not yet available for use in colorectal cancer screening.

Resumé

Notre but a été d'évaluer l'utilisation conjuguée, ou isolée, de la coloscopie virtuelle et de la détection de DNA humain muté dans les selles, comme méthodes de dépistage du cancer colorectal chez des individus à risque moyen, âgés de 50 à 74 ans, et leur impact sur la population. Nous avons utilisé un échantillon de 510 individus, statistiquement représentatif de la population madérienne.

Dans cette étude transversal et contrôlée, la coloscopie virtuelle par téléradiologie s'est révélée efficace. La coloscopie virtuelle a mis en évidence un pouvoir de diagnostic robuste, avec un degré élevé de prévisibilité concernant la présence ou l'absence de maladie. La coloscopie virtuelle a diagnostiqué 98,1% de sujets présentant des polypes adénomateuxes ≥ 6 mm, numéro supérieur à la coloscopie optique et cette différence a été statistiquement significative ($p=0.04$).

Bien que la coloscopie virtuelle ait été considérée comme nécessaire au dépistage du cancer colorectal par d'autres auteurs, la présente étude, tant que nous le sachions, est la première évaluation de sa performance, où la colonoscopie optique, en tant que méthode comparative, n'a eu pas d'accès préalable aux résultats de la colonoscopie virtuelle, obtenus *a posteriori*, dans un centre d'excellence lointain. Il a été confirmé que la sensibilité élevée de la coloscopie virtuelle est indépendante d'appareils de tomographie informatisée technologiquement très développés. Il a également été démontré que la coloscopie virtuelle possède une grande sensibilité pour des lésions de 6-9 mm (98%).

Les résultats de l'analyse de l'DNA humain muté dans les selles de la présente étude doivent être interprétés avec beaucoup de prudence, en prenant en compte les limitations méthodologiques et l'échantillonnage réduit. Ces facteurs limitent l'élaboration de conclusions généralisées et compromettent la sensibilité du panel moléculaire, et ont, de ce fait, inviabilisé l'application des tests d'ADN fécal ainsi dessinés au dépistage du cancer colorectal. La sensibilité et la spécificité du *L-DNA* fécal dans la détection de lésions avancées ≥ 6 mm et d'adénocarcinomes (13,89% et 84,54%) s'est située en-dessous de ce qui a été rapporté au niveau international (64% et 95%, respectivement) (Abbaszadegan MR et al 2007) et, dans le présent échantillon, ne s'est donc pas révélée être un bon marqueur moléculaire pour le dépistage de lésions coliques. Sa capacité à identifier des lésions coliques ne s'est pas révélée être associée à la taille de la lésion ou à la région où elle était localisée. Il faut néanmoins souligner que nous avons constaté une association de *L-DNA* à la détection de toutes les lésions polypeuses (28,6%), par comparaison aux lésions adénomateuses seulement (8,9%). En outre,

nous avons observé une tendance pour que le *L-DNA* soit plus fréquemment détecté chez des individus présentant un plus grand nombre de lésions coliques (38,5% vs 13,4%) et il est également significativement plus fréquent dans des échantillons de sexe féminin présentant 3 à 5 lésions coliques (62,5%, lorsque comparées à 14,3% dans des échantillons présentant 1 à 2 lésions). Par ailleurs, l'analyse de DNA dans les lésions coliques biopsées a donné des résultats qui se traduisent par d'importants bénéfices cliniques: l'identification d'altérations somatiques en *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* et *TP53* sont un complément de diagnostic, fournissant des indications pour la surveillance et le choix et la rationalisation de la thérapie pharmacologique.

La réalisation d'enquêtes de satisfaction (ESEC) a montré une bonne acceptation des examens de coloscopie virtuelle et de coloscopie optique, même réalisés le même jour et l'un après l'autre. Il existe, cependant, une tendance à une plus grande satisfaction par rapport à la coloscopie virtuelle ($p=0.00$).

En résumé, la coloscopie virtuelle s'est révélée être un examen de dépistage du cancer colorectal bien accepté par la population, non invasif et assez fiable. Il évite l'ablation non nécessaire de polypes chez plus de 70% des sujets et il est facile à mettre en œuvre avec des appareils moins sophistiqués et en bénéficiant de l'usage concomitant de la téléradiologie. Les bons résultats de l'étude de DNA fécal obtenus dans des laboratoires de référence ne sont pas encore généralisables. Les examens moléculaires fécaux ne sont pas encore disponibles pour être utilisés dans des dépistages du cancer colorectal.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

No mundo ocidental, o CCR está rapidamente a atingir o topo das causas de morte por cancro, quase a ultrapassar os cancros da mama, da próstata e do pulmão¹⁻³. Na grande maioria dos casos tem origem num pólipo adenomatoso que alcança a fase de cancro só ao fim de 10 a 15 anos, após várias transformações funcionais, histológicas e mutações genéticas^{4,5a, 5b, 5c}.

Enquanto uma pequena percentagem do CCR incide em doentes de alto risco, geneticamente predispostos (10 a 20%), a grande maioria ocorre esporadicamente em adultos de risco médio, assintomáticos, a partir dos 50 anos de idade (80%)⁶.

Rastreio significa a avaliação dos indivíduos no sentido de diagnosticar uma qualquer doença num estágio precoce do seu desenvolvimento e obedece a vários critérios ⁷⁴:

- a) A situação médica deve ser um importante problema de Saúde Pública;
- b) O desenvolvimento da doença passa por um período de latência assintomático e relativamente longo (vários anos);
- c) A história natural da doença deve estar bem definida e bem compreendida;
- d) Deve haver um esquema terapêutico devidamente formalizado, isto é, tratamentos baseados na evidência devem estar a ser usados;
- e) Devem procurar-se testes de rastreio com alta sensibilidade, de fácil aceitabilidade e realização, não cruentos ou pouco cruentos, e económicos.

Para além da eficácia e do custo, a aceitabilidade de um teste pelos indivíduos constitui um aspeto importante subjacente ao êxito de um programa de rastreio baseado nesse teste. A construção de uma ferramenta capaz de parametrizar esse maior ou menor grau de satisfação é uma etapa imprescindível de avaliação global do teste avaliado.

A introdução dum método de rastreio do CCR de âmbito nacional é, assim, uma medida importante e urgente na área da Saúde Pública, com reflexos sociais e económicos evidentes⁷⁻¹⁰.

Porque a prevalência do CCR detetado no rastreio numa população assintomática é muito baixa (<1%), foi definida como lesão-alvo o pólipo adenomatoso com 10 mm de diâmetro ou superior, contendo componentes vilosos ou displásicos ao exame histológico^{14, 5d}, lesão a que Little chama de *neoplasia avançada*. Apesar do interesse morfológico deste conceito em termos óticos, o conflito que desperta em termos anatomopatológicos leva a considerá-lo com muita precaução.

Contudo, não devemos esquecer as lesões planas, cuja incidência pode variar entre 7% e 44% dos adenomas. Uma lesão considera-se plana na CV e na CO quando a altura é ≤ 3 mm ou $\leq 2,5$ mm respetivamente. As lesões deprimidas são mais sujeitas a desenvolverem displasia de alto grau e transformação carcinomatosa do que as lesões elevadas ou totalmente planas. Representam quase sempre uma via carcinogénica ‘*de novo*’ e originam-se diretamente da mucosa colorretal normal, sem passarem por um componente adenomatoso. Uma lesão plana com depressão central e com mais de 6 mm de diâmetro, detetada na CV, obriga a avaliação e remoção imediata por CO ^{77, 78, 79}.

O princípio conceptual e a grande mais valia do rastreio do CCR são a triagem de prevenção do cancro, ao contrário do rastreio do cancro da mama, em que a intervenção assenta na deteção precoce do cancro.

Vários testes de rastreio têm sido utilizados: pesquisa de sangue oculto nas fezes, sigmoidoscopia/colonoscopia esquerda, associação dos dois métodos anteriores, clister opaco com duplo contraste, colonoscopia ótica total (CO)⁸, entre outros. A pesquisa de sangue oculto nas fezes tem uma sensibilidade baixa porque apenas deteta o sangue eliminado pela lesão-alvo: o CCR sangra intermitentemente e a lesão pré-cancerosa praticamente não sangra.¹⁵⁻²⁰. Contudo, é de realçar que o Hemoccult II foi o único teste prospetivamente avaliado e que provou diminuir a mortalidade por CCR^{67, 68}.

A sigmoidoscopia flexível/colonoscopia esquerda não preenche o critério estrutural de visualização de todo o intestino grosso e o clister opaco é um método insuficiente na tradução exata das alterações morfológicas da parede intestinal.

A controvérsia na sua utilização é enorme porque nenhum dos testes é ideal. A necessidade dum exame anatómico que contemple a observação de todo o intestino grosso elegeu a CO como teste *gold standard*¹¹⁻¹³.

Todavia, por diferentes ordens de razão, também a CO não é um método ideal de rastreio

porque:

- i - Apesar das campanhas publicitárias, menos de 50% das populações aderem à CO, exame considerado desagradável e embaraçoso; ²¹⁻²⁶
- ii - Os pólipos cólicos são frequentes a partir dos 50 anos e aumentam com a idade^{10,11}. No contexto dum rastreio do CCR, a prevalência de pólipos ≥ 10 mm, com displasia de alto grau e/ou transformação vilosa, é bastante baixa e aproximadamente de 5 a 10%. Quando se usa a CO para rastreio, todos os pólipos são removidos;
- iii - A polipectomia não é isenta de riscos, com a perfuração a obrigar a intervenção cirúrgica urgente;
- iv - A maioria dos pequenos pólipos são hiperplásicos ou o resultado duma resposta inflamatória não específica. Mesmo que fossem adenomas, são tão pequenos que o potencial para a degenerescência maligna provavelmente nunca será expresso durante a vida do doente; ^{27,28}
- v - Não haverá, ou será muito difícil que a Gastreenterologia tenha capacidade de resposta às solicitações dum rastreio nacional baseado na colonoscopia convencional ^{29,30};
- vi - Em Portugal, apesar da CO ser considerada o teste *gold standard*, a utilização de um especialista de gastreenterologia torna o custo/benefício de cada exame incomportável num rastreio nacional;
- vii - Em estudos de rastreio por CO em populações de risco médio, aproximadamente 60% dos adultos não têm evidência de lesões e 20 a 25% dos indivíduos têm 1 ou 2 pólipos subcentimétricos. Em termos de prevenção do cancro cólico, a deteção e remoção destes pólipos diminutos não traz qualquer benefício ao doente individual; ²⁸
- viii - É um exame observador-dependente, sendo que uma segunda CO, efetuada imediatamente após a primeira, deteta lesões não observadas anteriormente em 6% dos casos. ^{31,32}
- ix - Em casos de lesões obstrutivas ou semi-obstrutivas, a CO torna-se um exame inviável na avaliação do cólon a montante dessas lesões porque não ultrapassa as mesmas³³.

O debate tem girado à volta de duas questões nucleares, quanto às linhas orientadoras para rastreio:

- Deve a CO ser um exame único, universal, a efetuar por volta dos 60 anos, ou, em alternativa;
- Deve o objetivo geral do rastreio centrar-se na triagem pelos métodos menos invasivos e assim, deve a CO ser reservada para os casos positivos da seleção inicial? (teste fecal- pesquisa de sangue oculto ou DNA humano mutado)?

A colonoscopia virtual (CV) ou colonografia por tomografia computadorizada (CTC) é um exame iniciado nos últimos 15 anos como uma moderna técnica de imagem radiológica do cólon e potencial enorme para aplicação alargada em rastreios populacionais do CCR.

De fato, apenas em 1994 Vining e Gelfand construíram a primeira CV ³⁴, para em 1996, Hara et al. da Mayo Clinic³⁵, e em 1997, Royster et al. da Universidade de Boston³⁶, confirmarem a capacidade da CV para a deteção do pólipó (90%).

Em 1999, Fenlon et al.³⁷ confirmaram, definitivamente, a eficiência da CV, comprovando que a sensibilidade da CV era igual à CO na deteção de neoformações vegetantes, volumetricamente significativas, pólipos e neoplasias malignas. Com efeito, se a CV apenas diagnosticou 82% das lesões entre 6 e 9 mm, a sua sensibilidade aumentou para 91% nas lesões ≥ 10 mm e para 100% no carcinoma.

O grande potencial de evolução tecnológica permitirá o reforço da posição da CV, cuja relação custo-benefício, em termos de eficiência e comodidade, está já a afirmá-la como alternativa sólida no processo do rastreio do CCR, enquanto técnica inovadora. O seu carácter totalmente não invasivo tem cativado médicos e motivado doentes. A sua inocuidade está provada pela capacidade residual e desprezível de poder originar um cancro.³⁸ A necessidade de aprendizagem de leitura é um facto incontornável,^{26,39-48} mas a utilização de ferramentas de ajuda para o diagnóstico (CAD – Computed Assisted Diagnosis) ⁴⁹⁻⁵⁵ associada ao *faecal tagging* (marcação de resíduos fecais com corante),⁵⁶ aumentaram a sensibilidade e a especificidade do teste e diminuíram a taxa de falsos negativos. Os gastroenterologistas rapidamente compreenderão que a CV não é um teste competitivo, mas um teste de referência para mais colonoscopias óticas.

Se a Imagiologia já a interiorizou, a Gastroenterologia rapidamente virá a considerar a CV como

uma excelente metodologia diagnóstica e de referenciação de lesões do cólon. Na verdade, é já grande a preocupação em caracterizar a história natural dos pólipos detectados por CV. Novo e muito interessante debate é o que agora se centra na questão de como lidar com a lesão polipóide detectada pela CV, em termos de vigilância ou referência para polipectomia colonoscópica ^{46,47}.

As *guidelines* definidas pelo *Working Group on Virtual Colonoscopy* no 5º Simpósio Internacional de Colonoscopia Virtual de Boston, em Outubro de 2004, são (Quadro 1) ^{73,76}:

Quadro1.1 *Guidelines do Working Group on Virtual Colonoscopy*⁷⁶

Lesão	Pacientes (%)	Recomendações
Nenhum pólipó	40	Nenhuma ação Vigilância de rotina
Pólipo<6mm	30	Idem
Pólipo 6-9mm	20	Individualizar
Pólipo≥ 10mm	10	Colonoscopia ótica total

Substantivamente, o tema central de discussão que agora se inicia será o de equacionar sobre o tipo e o modo de vigilância a efetuar nos 20% da população com pólipos entre 6 e 9 mm.

Nesta perspetiva, o rastreio do CCR assume, naturalmente, papel dominante porque a questão centra-se no consenso quanto à indicação duma estratégia precisa ou dum teste simples para a triagem do CCR.

É no âmbito deste domínio do conhecimento que as alterações moleculares de mutações do DNA fecal de células esfoliadas de neoplasias colorretais, constitui hoje um outro campo de estudo muito promissor⁵⁷. A genética molecular do CCR constitui a base da análise do DNA fecal. Pelo menos 80% dos cancros colorretais resultam de instabilidade cromossómica, com aparecimento de mutações no gene *APC*, no gene supressor do tumor *p53* e no oncogene *K-Ras*. Os outros 15 a 20% de CCR envolvem a perda de genes que controlam a reparação de erros do DNA (*mismatch repair*, MMR genes) e manifestam-se pela instabilidade de

microsatélites. O CCR pode ainda ser detetado por duas outras vias: uso de marcadores de DNA associado a perturbação da apoptose (L-DNA ou DNA longo) e uso de marcadores de DNA associados a alterações epigenéticas traduzidas por fenómenos de metilação ^{27,58-61}. Vários estudos já provaram a exequibilidade desta tecnologia na deteção de lesões colorretais já identificadas por CO em estudos-piloto de rastreio de populações assintomáticas acima dos 50 anos ⁶²⁻⁶⁶.

A utilização individualizada dos testes de DNA fecal como método de rastreio simples e não invasivo do CCR, em substituição do Hemoccult II, não está ainda averiguada, embora Schubbert et al tenham comprovado que a sua sensibilidade é muito superior à pesquisa de sangue oculto nas fezes (40,8% versus 14,1%, $p < 0.001$, respetivamente) ⁶². A grande limitação diagnóstica dos testes de DNA assenta na baixa sensibilidade para a deteção de pólipos adenomatosos o que limita o seu valor como teste único, porque não detetam muitas lesões identificadas pela CO ⁶². Contudo, por ser muito mais sensível que o Hemoccult II ⁶², pode ser de grande utilidade num programa de rastreio do CCR, numa de duas alternativas:

- i - O seu uso, a intervalos regulares e suficientemente frequentes, pode ser tão efetivo na deteção das lesões poliposas como um teste muito mais sensível, mas usado infrequentemente, como a CO;
- ii - A sua utilização associada a um exame de CV pode ser determinante no esclarecimento do subgrupo da progressão neoplásica, no grupo de pólipos entre 6 a 9mm, que obrigatoriamente necessitará de CO.

A comunidade médica anseia que um painel molecular suficientemente amplo para detetar um máximo de tumores esporádicos, associado ao armazenamento adequado e ao envio atempado das fezes para análise, possa melhorar a sensibilidade do teste em relação aos pólipos de tamanho médio ou grande ^{58,62,72-74}.

A criação de um biobanco associado a este projeto de investigação das alterações mutagénicas do DNA fecal humano tornou-se indispensável como infraestrutura para recolha, armazenamento e distribuição de material biológico. No presente estudo foram recolhidas amostras de sangue, tecido e fezes, preservadas a -80°C e os respetivos DNAs a -20°C , suportadas por uma base de dados com informação clínica e que estão à disposição para estudos de investigação de novos testes de diagnóstico e para apoiar a formação científica pós-graduada de jovens licenciados, médicos e outros profissionais de saúde ⁸⁰⁻⁸⁴.

Portugal tem um programa de rastreio do CCR baseado num exame inicial de deteção de sangue oculto na fezes e cujas orientações programáticas estão contidas no Plano Nacional de Prevenção e Controle das Doenças Oncológicas 2007/2010, elaborado por uma equipe multidisciplinar e publicitado em Dezembro de 2007 (ver *site* da Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia). Juridicamente, emana da Resolução do Conselho de Ministros nº 129/2001 de 2 de Agosto, que definiu um Plano Oncológico Nacional inicial 2001/2005. Obedece a várias orientações baseadas na evidência dos últimos 10 anos, e que foram recentemente coletadas por especialistas da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) e publicadas pelo Conselho da Comissão Europeia num documento de 450 páginas, dividido em 10 capítulos ⁷⁵.

1.2 HIPÓTESE E OBJECTIVOS DO ESTUDO

A questão central que procurámos estudar no presente estudo é a posição que a CV e/ou o DNA fecal humano mutado podem representar numa estratégia de rastreio do CCR, comparativamente com a CO. Por forma a testá-la, definiram-se os seguintes objetivos específicos (procurando quantificar a sua qualidade e eficiência, de modo que possam ser, sustentadamente, utilizados com eficácia num programa de rastreio do CCR):

- i - Avaliar o desempenho da CV como método de rastreio do CCR;
- ii - Construção de um instrumento de avaliação da satisfação e comparação da aceitação pelos indivíduos rastreados dos 2 exames colonoscópicos;
- iii - Avaliar a capacidade de um painel de testes de DNA fecal humano mutado, já testado internacionalmente;
- iv - Avaliar a utilização conjugada dos dois métodos anteriores, para as mesmas circunstâncias;
- v - Constituição de um biobanco de DNA extraído de sangue, tecido biopsado e matéria fecal de todos os participantes

1.3 ESTRUTURAÇÃO GERAL DO RASTREIO E EQUIPAS DE TRABALHO

Este estudo necessitou da aprovação prévia de duas Comissões de Ética: inicialmente, dos Serviços de Saúde da Região Autónoma da Madeira (SESARAM, EPE) e em seguida da FMUL. Foi necessário também obter o apoio científico e financeiro do Instituto de Administração e Saúde (IA-Saúde), instituição da Secretaria Regional dos Assuntos Sociais (SRAS), para que, conjugadamente com a aceitação do Projeto de Investigação, fosse finalmente dado parecer favorável à realização do estudo conducente a doutoramento pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Estavam, assim, criadas as condições para que o trabalho de campo fosse efetuado na Região Autónoma da Madeira.

Através duma campanha nos meios de comunicação social, coordenada com a utilização de cartazes e *fliers* e informação aos profissionais de saúde no HCF e CS, a população da Madeira foi informada da realização dum estudo de rastreio do CCR para indivíduos de risco médio, entre os 50 e os 74 anos.

Metodologicamente, o estudo foi estruturado em sete etapas (Quadro 1.2):

- Etapa 1 - Delineamento experimental: estudo da dimensão da amostra e da posterior análise estatística
- Etapa 2 - Utilização dos meios de comunicação social para divulgação do projeto à população e informação e formação dos técnicos de saúde interessados (HCF, CS e elementos das equipas de trabalho)
- Etapa 3 - Admissão de rastreantes, efetuada pelo Investigador Principal, com fornecimento inicial da “Folha de informação ao sujeito” (Anexo 1), com explicação oral complementar detalhada dos exames a efetuar durante o rastreio e eventuais complicações, meios de as resolver, e despiste de indivíduos a excluir através da aplicação dum “Questionário de Exclusão” (Anexo 2). Aos rastreantes admitidos foi nesta fase lido em voz alta um “Consentimento Informado” (Anexo 3), que após aceite, foi assinado de acordo com a mesma assinatura do BI/CC e foi fornecido um folheto de “Instruções para colheita de fezes e sangue” (Anexo 4)
- Etapa 4 - Colheita, armazenamento em arca refrigerada a -20° e envio das amostras de fezes e de sangue para o LGH-UMa, num período de tempo inferior a duas horas. Fornecimento de folheto com as “Instruções para a preparação cólica” (Anexos 5).

Etapa 5 - Após a preparação intestinal, no dia imediato, de manhã e pelas 8 horas, execução sequencial da CV seguida da CO. Após pausa obrigatória de trinta minutos, aplicação do “Questionário de satisfação” (Anexo 8)

Por protocolo, todas as lesões detetadas durante a CO foram removidas e cortadas para exame histológico e genético, sendo uma metade enviada para o Laboratório de Anatomia Patológica (LANA) e a outra metade para o LGH-UMa

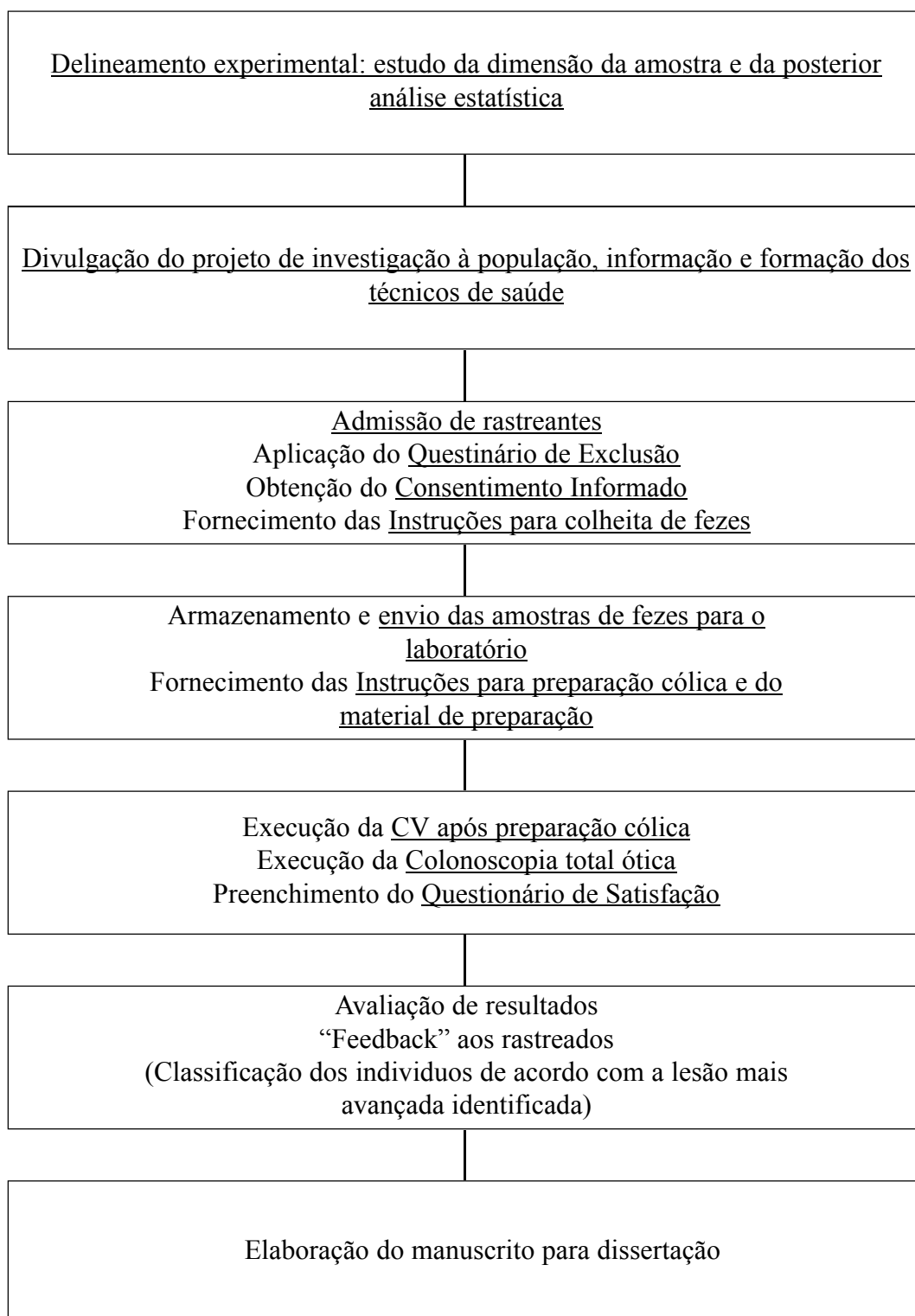
Etapa 6 - Análise e interpretação dos resultados, com informação aos rastreados quanto à classificação das lesões clinicamente importantes

Etapa 7 - Elaboração do manuscrito para dissertação

O anonimato e confidencialidade dos registos foram garantidos com a utilização de um número de identificação e o recurso a uma base de dados em suporte informático, com acesso apenas com credenciais autorizadas.

Todos os médicos, biólogas e psicólogas envolvidos no Projeto são especialistas muito experimentados. A CV, efetuada pelo Dr. António Rodrigues, com mais de vinte anos de experiência em tomografia computadorizada, foi avaliada por teleradiologia pelo Dr. Philippe Lefere do VCTC (Virtual Colonoscopy Teaching Center), coadjuvado, sempre que necessário, pelo seu colega de trabalho, Dr. Stefaan Gryspeerdt, ambos com grande experiência em CV (mais de 5.000 exames analisados). Os cinco gastroenterologistas, Drs. Ricardo Teixeira, Henrique Morna, Isabel Jardim, Carla Andrade e Goreti Faria, têm pelo menos quinze anos de experiência clínica, incluindo a execução de endoscopias. Os exames histológicos foram efetuados pelo Dr. Francisco Henriques de Gouveia, Chefe de Serviço de Anatomia Patológica, definidos segundo classificação histológica identificada no Anexo 7. A aplicação dos “Questionários de satisfação” foi feita por especialistas em Psicologia devidamente habilitadas, sob a orientação da Prof^a Doutora Glória Franco, Professora Auxiliar na UMa. Os exames genéticos e moleculares foram executados pela Prof^a Doutora Alexandra Rosa, Professora Auxiliar Convidada na Unidade de Ciências Médicas da UMa e Colaboradora do LGH-UMa, e pela Mestre Sara Gomes.

Quadro 1.2 Fluxograma do Projeto de Investigação



Colonoscopia virtual

2. COLONOSCOPIA VIRTUAL

2.1 CONCEITO

Após um período introdutório de quinze anos de refinamentos tecnológicos e de apuramento da metodologia diagnóstica, a CV afirma-se hoje como um exame radiológico do cólon e reto em toda a sua extensão que permite detetar lesões tumorais, benignas ou malignas, através da visualização combinada de imagens 2D e 3D, estas últimas obtidas por reconstrução de 500 a 600 cortes 2D¹. Fato importante de registo é que, como qualquer exame de imagem, a CV deteta ‘formas’ em massa e volume, e não a sua natureza histológica.

A técnica comporta quatro tempos: preparação intestinal, distensão da parede intestinal, aquisição de imagens em cortes e interpretação das mesmas⁶¹:

- i - A preparação intestinal decorre num único dia, a véspera da realização do exame, e consta duma dieta pobre em resíduos, sem gorduras, para redução do volume fecal. Administração de laxantes para acelerar o trânsito intestinal e tornar o cólon tão limpo quanto possível. Fixação de conteúdo fecal residual através da ingestão de produtos com bário e/ou iodo (*faecal tagging*);
- ii - A distensão da parede intestinal obtêm-se pelo relaxamento do músculo liso através da injeção intravenosa de 20 mg de butilbrometo de escopolamina, seguida pela insuflação cólica de dióxido de carbono (CO₂), através de cateter retoanal, com monitorização automática da pressão de insuflação com aparelho apropriado (PROTOCO₂ EVM). O procedimento é feito de forma gradativa e tendo em atenção o conforto e a tolerância do indivíduo. O relaxante do músculo liso limita os espasmos da parede, indutores de falsas imagens. Como o dióxido de carbono é altamente difusível, após uma adequada distensão cólica, favorecida pelo posicionamento do indivíduo em duas posições sequenciais de supinação e pronação/decúbito lateral esquerdo, a sensação de distensão abdominal desaparece rapidamente .
- iii - Não há administração de contraste intravenoso. As aquisições de imagens, obtidas em poucos segundos, são efetuadas nas posições de supinação e pronação ou decúbito lateral esquerdo e fazem-se através dum *CT scanner* multicorte com utilização duma baixa dose de radiação (50 mAs) e espessura de cortes de 1.5 mm.
- iv - A interpretação das imagens decorre numa estação de trabalho com *software* apropriado, a qual reporta dois tipos de lesões: lesões com expressão intraluminal e lesões extra-cólicas.

O exame comporta dois tipos de riscos ou complicações, nomeadamente: o risco de cancro induzido pela radiação e a perfuração da parede intestinal.

O risco de lesões pela radiação é hoje negligível ³¹. Com as novas tecnologias houve uma redução de 50% das doses de radiação utilizadas. O risco de perfuração cólica é também muito reduzido (0.01 a 0.06%) ³²⁻³⁴, e apenas há um caso descrito na literatura internacional, tratado conservadoramente, quando a CV foi utilizada como teste de rastreio ³⁴. Na CV diagnóstica há 18 casos descritos, 12 dos quais não necessitaram de intervenção cirúrgica, e não houve mortalidade ³⁴. De salientar que esta técnica não deve ser utilizada em indivíduos com doença inflamatória do intestino.

2.2– REVISÃO DA LITERATURA

Desde 2008 que a CV é considerada como mais uma ferramenta útil no rastreio do CCR em populações de ‘risco médio’¹. Alguns estudos de amostras robustas conseguiram resultados de confiança na deteção de pólipos ≥ 6 mm (Quadro 2.1) ^{2-4,21,22,35,61}.

Contudo, estes estudos provêm apenas de alguns centros académicos de excelência, com grupos de radiologistas altamente treinados⁶, e pretendem atingir três grandes objetivos: estudo dos pólipos, desde os hiperplásicos aos adenomatosos; estudo do carcinoma colorretal, segundo a sequência adenoma-carcinoma; estudo da lesão ≥ 10 mm com presença de componentes viloso e/ou alto grau de displasia, numa proporção $\geq 25\%$ ¹².

Quadro 2.1 Colonoscopia virtual: estudos de centros académicos de excelência

Grupo de estudo	Ano	Nº Indiv	% Homens	Sensibilidade (%)			PPV (%)	NPV (%)
				≥ 6 mm	6-9 mm	≥ 10 mm		
Pickhardt P et al NEJM ²	2003	1233	59	89	89	94	30	NR
Macari et al Radiology ⁶²	2004	68	100	NR	53	100	NR	NR
Kim D et al NEJM ³	2007	6283	44	NR	NR	NR	NR	NR
Cornett et al Am J Gastr ⁶³	2008	159	51	NR	82	94	NR	NR
Johnson CD et al NEJM ⁴	2008	2600	48	78	78	90	45	90
Regge D et al JAMA ²²	2009	937	NR	85	NR	NR	62	96
Graser A et al Gut ²¹	2009	311	55	91	92	92	48	84
de Haan et al Eur Rad ⁶⁴	2011	4086	NR	NR	79	88	NR	NR

Os pólipos < 6 mm são denominados pólipos pequenos ou diminutos: 35 a 50% são adenomatosos, 2.7 a 3.4% são lesões pré-neoplásicas e a incidência de carcinoma varia de 0 a 0.1%²; a sensibilidade da CV é baixa, com uma taxa de omissão de 26 a 27 %³⁶⁻³⁸. A maioria dos estudos recentes (Quadro 2.1) desprezam-nos, considerando-se que as lesões importantes, após crescimento lento, serão detetadas em exames posteriores. Os pólipos entre 6 e 9 mm são denominados pólipos pequenos a intermédios: 60 a 70% são adenomatosos, 4 a 9.7% são lesões pré-neoplásicas e a incidência de cancro varia entre 0.5 a 1.0%; a sensibilidade da CV é alta, com uma taxa média de omissão de 13%^{2,4,21,22}. Assim, devemos sublinhar que as lesões diminutas não necessitam ser reportadas pela CV, e que as ≥ 6 mm detetadas pela CV têm indicação para ser removidas por CO⁶⁷. Os pólipos ≥ 10 mm são considerados grandes pólipos em que é obrigatória a realização duma CO terapêutica e/ou diagnóstica. A sensibilidade da CV é alta, com uma taxa de omissão de 2.1 a 6%^{2, 4, 21}. A detecção de adenocarcinoma pela CV nos diversos estudos variou entre 86 e 100%, com um valor médio de 94% (Quadro 2.2)^{2, 4, 21, 22, 65, 66}. É de realçar que o diagnóstico histológico definitivo é pertença da Anatomia Patológica. A CO também não faz diagnóstico absoluto, apenas indicia suspeita pela morfologia.

Quadro 2.2 Sensibilidade da CV na detecção de adenocarcinoma

Estudo	Ano	Sensibilidade	
		Deteção	%
Pickhardt P et al NEJM ²	2003	2/2	100
Halligan S et al Trials ⁶⁵	2007	1195/1285	93
Johnson CD et al NEJM ⁴	2008	6/7	86
Regge D et al JAMA ²²	2009	39/41	95
Graser A et al Gut ²¹	2009	1/1	100
von Wagner C et al Eur Radiol ⁶⁶	2011	538/538	100

Os resultados estatísticos referentes a estudos de centros de excelência evidenciam claramente que a CV aproxima-se dos valores da CO, teste de referência.

Em resumo, quais são então as indicações atuais para a realização duma CV? Seguramente em todas as situações de falência da CO: após uma CO incompleta, nas contraindicações da CO

(anticoagulação, doença cardiopulmonar grave, doente idoso fragilizado), na situação de recusa da CO. Mas isto é pouco e muito redutor, o que pretendemos estudar vai no sentido de podermos afirmar que a CV é alternativa segura e eficiente à CO.

Existem bons resultados no rastreio individual de CCR com CV quando o grupo de radiologistas é experiente (Quadro 2.3)³.

Quadro 2.3 Experiência da CV no rastreio individual ³

	CV	CO
Nº Indivíduos	3120	3163
Polipectomia	250 (8%)	2434 (77%)
Lesões pré-neoplásicas	123 (3,9%)	121 (3,9%)

A análise dos resultados do Quadro 2.3 é bastante interessante:

- i - Não há diferenças entre as duas colonoscopias na deteção das lesões pré-neoplásicas, isto é, ambas cerca de 3,9% ($p=0.80$);
- ii - Só 8% dos indivíduos que se submeteram à CV é que necessitaram de fazer CO;
- iii - A razão de polipectomias nos dois grupos CV:CO foi de cerca de 1:5, isto é, na CO removeram-se todos os pólipos, incluindo os diminutos, enquanto que na CV só foram removidos pólipos ≥ 6 mm, em 8% dos casos;
- iv - Foram observadas menos complicações na CV (apenas um caso tratado conservadoramente e já anteriormente descrito)³.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Técnica

A CV foi efetuada no Núcleo de Imagem Diagnóstica, centro radiológico situado na Clínica de Santa Catarina, Funchal.

Todos os rastreados submeteram-se a uma preparação cólica, consistindo numa dieta sem resíduos iniciada três dias antes dos exames, limpeza catártica e administração de produto corante de resíduos fecais (*faecal tagging*) na véspera. Para a limpeza intestinal utilizou-se uma combinação de dois comprimidos de 5mg de bisacodil (Dulcolax, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemanha) e 2X15.08 g de picossulfato de sódio (CitraFleet, De Witt, Cheshire, Reino Unido). Para a coloração dos resíduos fecais utilizou-se 225 ml duma suspensão de bário a 4.2% peso/volume (EZ CAT, Bracco, Milano, Itália) e 50 ml de amidotrizoato de meglumina e amidotrizoato de sódio (Telebrix Gastro, Guerbet, Villepinte, França) (Anexo 5). Tem havido alguma preocupação quanto à utilização pouco criteriosa de fosfato de sódio oral como produto de limpeza intestinal, o qual pode provocar nefropatia aguda com diminuição da função renal e necessidade de diálise e em indivíduos mais suscetíveis, idosos, portadores de insuficiência renal crónica que tomam diariamente diuréticos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina ou bloqueadores dos recetores da angiotensina, anti-inflamatórios não esteroides, bem como os que padecem de insuficiência cardíaca ou de desequilíbrio hidroeletrólítico^{39,43-60}. Os esquemas de preparação cólica adotados tiveram em conta todas as anteriores considerações, que foram despistadas no momento da admissão dos rastreados pelo investigador principal.

Após relaxamento do músculo liso com injeção intravenosa de butilbrometo de escopolamina (Buscopan[®], Boehringer Ingelheim) e insuflação automática do cólon com dióxido de carbono (PROTOCCO 21, Bracco, Milano, Itália), todos os indivíduos foram examinados com duas aquisições (supinação/pronação ou supinação/decúbito esquerdo).

A CV realizou-se num *CT Scanner* de 6 cortes (Emotion G, Siemens, Forchheim, Alemanha), usando 130 KW (=default setting), 50 mAs, uma colimação de corte de 1.5 mm, 600 msec de rotação de tubo. O tempo de aquisição para cada conjunto de imagens foi de 25-30 segundos. As imagens foram reconstruídas com uma espessura de corte de 1.25 mm e um intervalo de 1 mm. Neste estudo, o *hardware* utilizado permitiu um exame de CV em 64 segundos.

2.3.2 Garantia de Qualidade

Todos os rastreados receberam uma cuidadosa informação sobre a preparação cólica. Para assegurar uma CV de boa qualidade que permitisse uma adequada interpretação, a preparação e a distensão cólicas foram escurpulosamente monitorizadas no Centro de Teleradiologia da Bélgica, usando uma escala de três valores (Quadro 2.4). Considerou-se como falsos positivos os casos em que um segmento cólico ou parte dele não era visualizado em ambas as aquisições de supinação e pronação, devido a má preparação ou deficiente distensão. Na prática clínica corrente isto deverá desencadear a realização duma CO.

Quadro 2.4 Sistema de classificação para a monitorização da qualidade da CV

Score	Preparação	Distensão
1	Fezes não impregnadas pelo corante ou impregnação não homogénea, impedindo a interpretação	Colapso
2	Idem, mas não impedindo a interpretação	Espaço endoluminal patente. Má qualidade da imagem 3D
3	Impregnação fecal homogénea	Distensão adequada

2.3.3 Transferência de imagens e interpretação

As imagens adquiridas foram enviadas em formato DICOM para o Centro de Teleradiologia de Hoogdele, Bélgica, através do sistema comercial de transferência YouSendIt, Campbell, CA, USA, e transferidas para estação de trabalho móvel (EliteBook 8730w, Hewlett-Pakard, Palo Alto, CA, USA) provida com software adequado (Vitreia; Vital Images, Minnetonka, MI, USA).

Todos os exames foram analisados com um método de interpretação 3D primário, com imagens em 2D para resolução de eventuais dificuldades de caracterização das lesões. O relatório da CV era então registado na base de dados criada antecipadamente pelo investigador principal.

2.3.4 Colonoscopia Ótica (CO)

Após a realização da CV, os rastreados submetiam-se imediatamente à CO sob sedação consciente com 3mg endovenosos de midazolam, não sendo necessária qualquer preparação cólica adicional. Nenhum dos produtos utilizados, nas quantidades referidas, são deletérios para o colonoscópio. A CO foi efetuada por um dos cinco gastroenterologistas referenciados que observaram rigorosos critérios de qualidade de execução (Anexo 6). As lesões foram divididas em pólipos não-neoplásicos, adenomas (LGD e HGD) e carcinoma¹¹. Todos os pólipos detectados, incluindo os diminutos (< 6mm) foram removidos, registados e enviados pelo investigador para exame histológico e genético.

2.3.5 Cruzamento das lesões

A CV e CO foram comparadas para todas as lesões refenciadas. Qualquer dos operadores, gastroenterologista e radiologista, desconheciam sempre a informação do outro. No caso duma CO incompleta, a CV foi comparada com a CO nos segmentos examinados por esta. A CO foi considerada o exame padrão. Todas as lesões foram comparadas quanto ao número, tamanho e localização. O cruzamento das lesões (comparação volumétrica das mesmas lesões identificadas e caracterizadas pelos dois exames) foi definido por consenso. A CO definia o tamanho da lesão com uma pinça de biopsia aberta. Na CV, as lesões foram medidas nas imagens 2D usando uma combinação janela/nível de 1500/-200 unidades Hounsfield¹³⁻¹⁵. As lesões foram classificadas como <6 mm, 6-9 mm e ≥ 10 mm. Uma lesão era considerada cruzada se pertencia ao mesmo tamanho ou a um tamanho aproximado, ou se a lesão tivesse qualquer tamanho maior que a lesão detectada pela CO, e ainda se a mesma estivesse localizada no mesmo ou num segmento cólico adjacente¹⁶. O sistema de avaliação dos segmentos cólicos pela CO dita “não cega” não foi possível porque a interpretação da CV foi sempre efetuada depois da execução da CO, não podendo, por isso, influenciar a observação endoscópica. Por este motivo, um método de localização mais detalhada das lesões foi adotado, em comparação com estudos anteriores. O cólon foi dividido em onze segmentos: reto inferior (parte do reto abaixo da valva rectal inferior), reto médio e reto superior (parte do reto acima da valva rectal superior), sigmoide, cólon descendente, ângulo esplénico, cólon transversal, ângulo hepático, cólon ascendente, cego e válvula ileo-cecal. Este método permitiu um cruzamento mais preciso das lesões. Para a listagem final das lesões o cólon foi dividido em seis segmentos, (Quadro 2.9, página 32). Nos casos em que a CV detetou lesões com alto grau de probabilidade, que não foram detectadas e recuperadas durante a CO, foi proposto uma

CO de revisão, sabendo agora o endoscopista o resultado da CV. Em caso de confirmação, os resultados foram adicionados como positivos verdadeiros em relação à referência padrão. Em alguns destes casos, o exame de CO de revisão continuou normal, apesar dos achados da CV serem altamente sugestivos de lesão, e nesta eventualidade foi proposto aos rastreados uma CV de revisão. No caso duma CV negativa, a CV inicial foi considerada um falso positivo. No caso da CV de revisão confirmar a CV inicial, o indivíduo foi retirado do cálculo dos resultados.

2.3.6 Análise estatística

Tendo em vista responder às hipóteses formuladas, a dimensão da amostra foi calculada para um erro máximo de estimativa de 5% com 95% de confiança, tendo em conta a distribuição da população da ilha da Madeira, de acordo com a idade e o sexo. Cerca de 50% da população com ≥ 50 anos foi considerada elegível para o estudo. Os índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo (PPV, NPV), razões de verosimilhança positiva e negativa (LH+, LH-), foram calculados para todas as lesões $\geq 6\text{mm}$ e $\geq 10\text{mm}$. O padrão de referência foi a CO inicial, a que se adicionou as lesões detectadas nas CO de revisão ou através de cirurgia.

A sensibilidade foi calculada como a proporção de indivíduos com lesão na CV em relação aos testes positivos da CO (teste de referência). A especificidade foi calculada como a proporção de rastreados sem lesão na CV em relação aos testes negativos da CO. O valor preditivo positivo (PPV) foi calculado como a proporção de pessoas com diagnóstico positivo pelo teste padrão sobre os indivíduos com CV positivo. O valor preditivo negativo (NPV) foi determinado como a proporção de indivíduos com o teste de referência negativo sobre aqueles com uma CV negativa. A precisão (*accuracy*) foi obtida com a proporção de resultados certos da CV sobre toda a amostra. A razão de verosimilhança positiva (LH+) foi calculada como a proporção de indivíduos com uma CV positiva relativamente aos indivíduos com CO positiva, dividida pela proporção de indivíduos com uma CV positiva relativamente aos que tiveram um resultado negativo na CO. A razão de verosimilhança negativa (LH-) resulta da proporção de rastreados com CV negativa relativamente aos indivíduos com CO positiva, dividida pela proporção de indivíduos com diagnóstico negativo na CO e com CV negativa.

A análise estatística dos resultados teve por base o teste de McNemar⁴⁰⁻⁴², com a utilização do *software* SPSS (PASW) 18.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Caracterização da amostra

Foram observados 514 indivíduos entre Maio de 2010 e Maio de 2011, dos quais 510 foram submetidos a CV seguida de CO (dois indivíduos recusaram a CO e perderam-se as imagens de CV de outros dois). A CO foi incompleta em 30 rastreios, o que corresponde a uma taxa de 6% de CO totais. Nestes 6% foi possível examinar 85 segmentos da CO, os quais foram incluídos no estudo. Não houve eventos adversos. Dos 510 participantes submetidos a CV, 59.5% (304) dos elementos da amostra são do sexo feminino e 40.5% (206) são do sexo masculino (Figura 2.1).

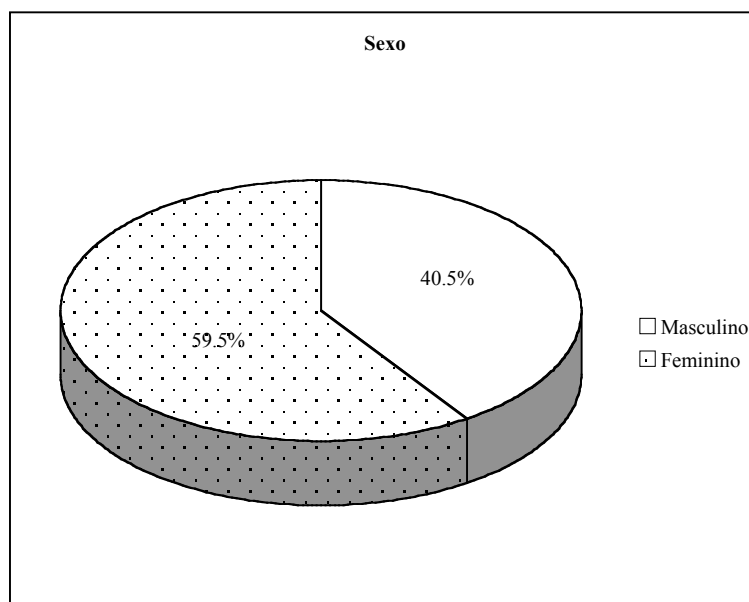


Figura 2.1 Distribuição dos indivíduos da amostra por género

No que diz respeito à idade, observou-se que os participantes têm uma idade média 59.7 anos, com desvio padrão de 6.4 anos. No que respeita a esta variável, e para uma melhor caracterização da amostra, optou-se por organizar os dados de duas formas:

- i - faixas etárias com intervalo de dez anos, onde vemos que a mais representada é aquela que compreende os indivíduos entre os 50 e os 59 anos, com 56% dos elementos da amostra (Figura 2.2);
- ii - faixas etárias com intervalo de 5 anos, onde a classe mais frequente é a de 50-54 anos (29.2%) (Figura 2.3).

Quanto ao concelho de residência, podemos verificar que 67.5% dos elementos da amostra residem no concelho do Funchal (Figura 2.4).

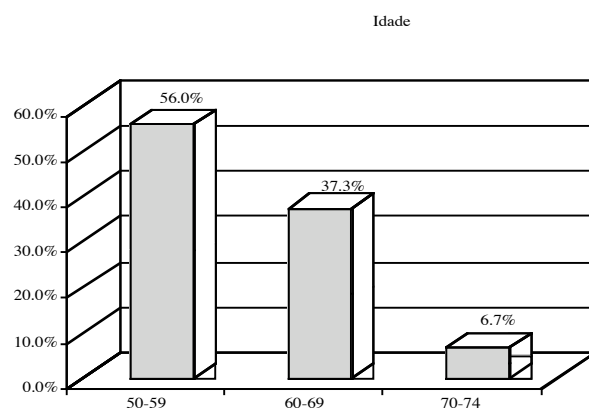


Figura 2.2 Distribuição dos indivíduos da amostra por faixas etárias com intervalos de 10 anos

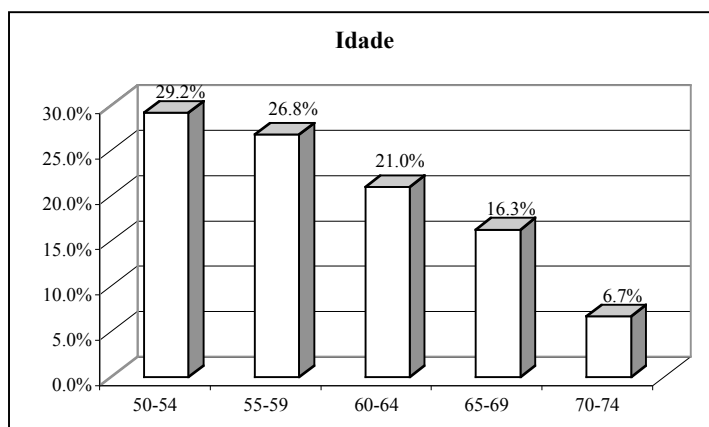


Figura 2.3 Distribuição dos indivíduos da amostra por faixas etárias com intervalos de 5 anos

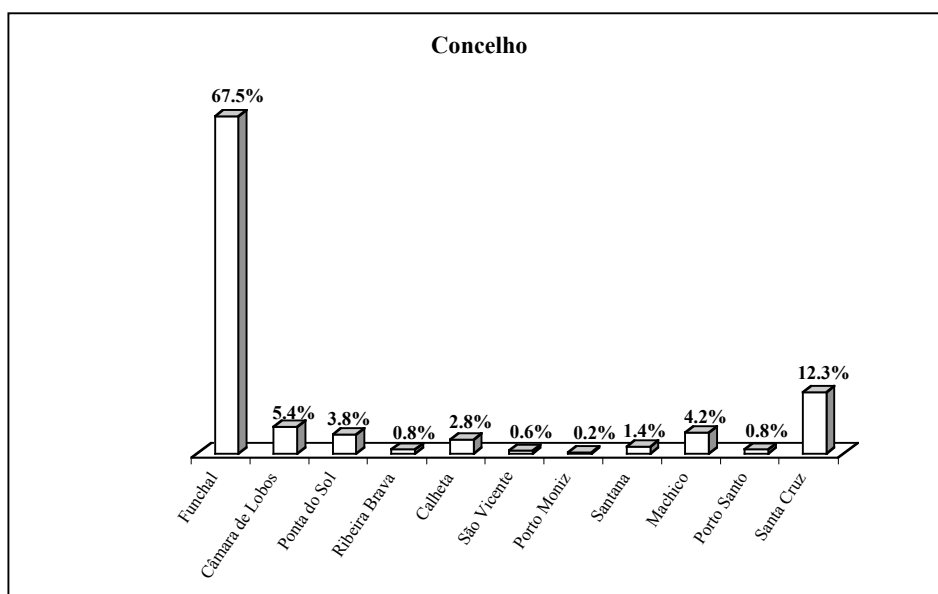


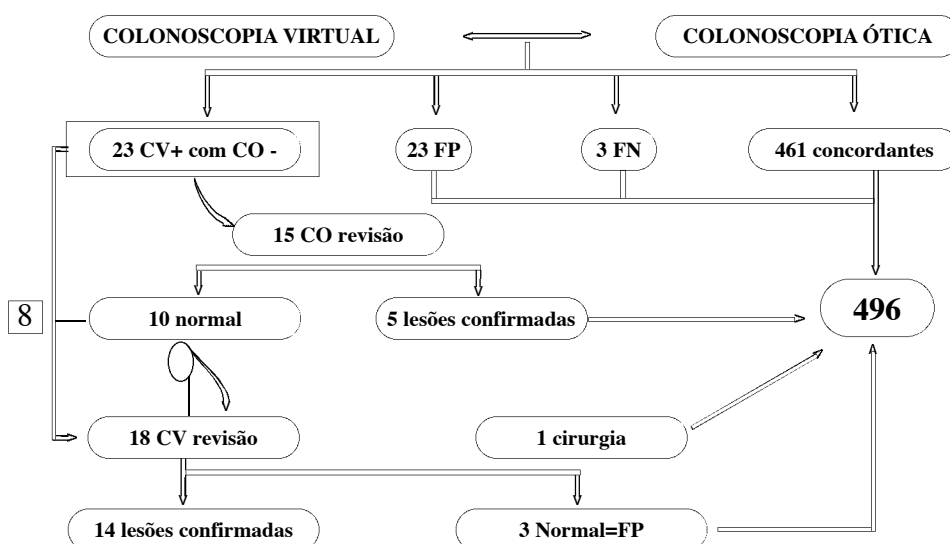
Figura 2.4 Distribuição dos indivíduos da amostra por Concelho de Residência

2.4.2 Características por indivíduos

O fluxograma dos rastreados está representado no Quadro 2.5. Após o cruzamento dos resultados da CV com os da CO obtiveram-se 461 resultados concordantes, 3 falsos negativos (FN) e 23 falsos positivos (FP), isto é, 487 casos que somaram para o cálculo de resultados. Noutros 23 casos, a CV evidenciou lesões não detetadas pela CO. Destes, 15 aceitaram submeter-se a uma CO de revisão que confirmou 5 lesões, mas continuou a considerar normal 10 casos. Estes 10 casos, em conjunto com os 8 que recusaram a CO de revisão, aceitaram a realização de uma CV de revisão. Num dos casos, as imagens eram fortemente sugestivas de lesão maligna cecal, o que motivou hemicolectomia direita laparoscópica imediata. 3 casos foram normais e por isso considerados como FP, perfazendo um total de 26 FP no estudo. Em 14 casos a CV de revisão continuou a evidenciar lesões, pelo que foram retirados do estudo e submetidos a um programa de *follow-up*. Assim sendo, preferiu-se uma amostra de 496 indivíduos resultantes dos 487 iniciais com os 9 casos obtidos quer da CO quer da CV de revisão (5+1+3).

Em 427 (86.1%) destes, o cólon não evidenciou lesões ≥ 6 mm. Em 53 indivíduos, cada uma das técnicas detetou pelo menos um adenoma ≥ 6 mm. Em 16 participantes apenas foram detetados pólipos hiperplásicos ≥ 6 mm. As características da performance da CV numa base por indivíduo para a deteção de pelo menos um adenoma ≥ 6 mm estão listadas no Quadro 2.6. Os Quadros 2.7 e 2.8 completam as informações do Quadro 2.6.

Quadro 2.5 Fluxograma dos rastreados



Quadro 2.6 Avaliação da precisão da CV com intervalos a 95% de confiança

	$\geq 6\text{mm}$ Todos os pólipos	$\geq 6\text{mm}$ Adenomas	$\geq 6\text{mm}$ Adenomas c/ HGD e/ou transf. vilosa	$\geq 10\text{mm}$ Todos os pólipos	$\geq 10\text{mm}$ Adenomas c/ HGD e/ou transf. vilosa
N Total	69	53	32	32	26
Sensibilidade	0.96 (0.87-0.99)	0.98 (0.89-1)	1 (0.87-1)	1 (0.85-1)	1 (0.84-1)
Especificidade	0.94 (0.91-0.96)	0.91 (0.88-0.93)	0.87 (0.84-0.90)	0.98 (0.96-0.99)	0.98 (0.96-0.99)
PPV Valor preditivo positivo	0.72 (0.61-0.80)	0.56 (0.46-0.67)	0.35 (0.25-0.45)	0.74 (0.56-0.86)	0.74 (0.56-0.86)
NPV Valor preditivo negativo	0.99 (0.98-1)	0.99 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)
Razão de verossimilhança positiva (LH+)	15.71 (10.79-22.88)	10.86 (8.07-14.63)	7.73 (6.10-9.79)	46.8 (25.35-84.40)	52.22 (27.3-99.7)
Razão de verossimilhança negativa (LH-)	0.05 (0.02-0.14)	0.02 (0-0.14)	0	0	0

Quadro 2.7 Utilização da CV como Método de Rastreio - I
Características da CV por Indivíduo

		≥ 6 mm			≥ 10 mm	
		TODAS	ADENOMAS	ADENOMAS COM HGD E/OU TRANSF. VILOSA	ADENOMAS COM HGD E/OU TRANSF. VILOSA	ADENO CARCINOMAS
Prevalência	%	13.9	10.7	6.5	5.2	0.8
	95% CI	11-17.3	8.2-13.8	4.5-9	3.5-7.7	-
	N	69/496	53/496	32/496	26/496	4/496
Sensibilidade	%	95.65	98.11	100	100	100
	95% CI	87-98.9	89-100	87-100	84.4-100	-
	N	66/69	52/53	32/32	26/26	4/4
Especificidade	%	93.91	90.97	87.07	98.08	100
	95% CI	91.1-95.9	87.8-93.4	83.6-89.9	96.3-99	-
	N	401/427	403/443	404/464	461/470	492/492

Quadro 2.8 Utilização da CV como Método de Rastreio - II
Características da CV por Indivíduo

		≥ 6 mm			≥ 10 mm	
		TODAS	ADENOMAS	ADENOMAS COM HGD E/OU TRANSF. VILOSA	ADENOMAS COM HGD E/OU TRANSF. VILOSA	ADENO CARCINOMAS
PPV	%	71.4	56.52	34.78	74.29	11.43
	95% CI	61.2-80.4	45-66.7	25.3-45.5	56.4-86.9	-
	N	66/92	52/92	32/92	26/35	4/35
NPV	%	99.26	99.7	100	100	-
	95% CI	97.7-99.8	98.4-99.9	98.8-100	99-100	-
	N	401/404	403/404	404/404	461/461	-
LH+	%	15.71	10.86	7.73	52.22	-
	95% CI	10.8-22.9	8.1-14.6	6.1-9.8	27.3-99.7	-
LH-	%	0.05	0.02	0	0	-
	95% CI	0.02-0.14	0.03-0.15	-	-	-

Nestes indivíduos, a prevalência de todas as lesões ≥ 6 mm e adenomas ≥ 6 mm foi 13.9% e 10.7%, respectivamente. Os pólipos ≥ 10 mm estiveram presentes em 32 indivíduos (6.5%). Houve 4 casos (0.8%) com adenocarcinoma.

A CV detetou 98.1% (95% IC, 88.6 – 99.9%) dos indivíduos com adenomas ≥ 6 mm e diagnosticou corretamente todos os casos de ≥ 10 mm.

A CO obteve uma sensibilidade por indivíduo de 90.6% para os adenomas ≥ 6 mm e de 92.3% para os pólipos ≥ 10 mm. A CO não detetou lesões significativas em 5 indivíduos: dois adenomas 6-9 mm com displasia de baixo grau (LGD), um pólipo de 6-9 mm com displasia de alto grau (HGD) e dois adenocarcinomas ≥ 10 mm. Estas lesões foram removidas por CO de revisão em 4 casos e por cirurgia num caso. Três destes casos estavam localizados no cólon direito, incluindo dois adenocarcinomas.

Considerando todos os indivíduos com pólipos hiperplásticos como verdadeiros positivos, a CV obteve uma especificidade de 93.9% com um PPV (valor preditivo positivo) de 71.7%. Considerando todos os indivíduos com pólipos hiperplásticos como falsos positivos, a especificidade para adenomas ≥ 6 mm foi de 90.5% com um PPV de 55.3%.

A discordância entre a CV e a CO na detecção de adenomas ≥ 6 mm foi significativa com a CV detetando mais adenomas ≥ 6 mm do que a CO ($p=0.04$, teste de McNemar).

A Tabela 2.1 evidencia a comparação das características por indivíduo e por pólipo da CV e da CO.

2.4.3 Características por pólipos

A distribuição dos pólipos por segmento cólico está listada no Quadro 2.6, sendo que um total de 62 adenomas ≥ 6 mm foram removidos. As características por pólipo dos resultados da CV e da CO estão listadas na Tabela 2.1. A CV não diagnosticou 5 lesões: 3 pólipos hiperplásticos (HP), 1 adenoma LGD 6-9 mm e 1 HP ≥ 10 mm. Daqui resultou uma sensibilidade para a CV de 98.4% e 100% para adenomas ≥ 6 mm e adenomas com HGD e/ou transf. vilosa (adenomas pré-neoplásicos) ≥ 6 mm, respectivamente.

A CO obteve uma sensibilidade de 91.9% e 92.6% para todos os adenomas ≥ 6 mm e adenomas com HGD e/ou transf. vilosa ≥ 6 mm, respectivamente, não tendo detetado 5 lesões, duas das quais eram adenomas

Tabela 2.1 Comparação das características por indivíduo e por pólipos da CV e da CO

Caraterísticas por indivíduo		CV			CO	
	%	(95% CI)	N		(95% CI)	N
Adenomas						
≥6 mm	98.1	(88.6-99.9)	52/53	90.6	(78.6-96.5)	48/53
6-9 mm	96.3	(79.1-99.8)	26/27	88.8	(69.7-97.1)	24/27
≥10 mm	100.0	(84-100)	26/26	92.6	(74.2-98.7)	24/26
Adenomas com HGD e/ou transf. vilosa (adenomas pré-neoplásicos)						
≥ 6mm	100.0	(86.7-100)	32/32	90.6	(73.8-97.5)	33/36
6-9 mm	100.0	(51.7-100)	6/6	88.9	(50.7-99.4)	8/9
≥ 10mm	100.0	(84-100)	26/26	92.3	(73.4-98.6)	24/26
Caraterísticas por pólipo						
	%	(95% CI)	N		(95% CI)	N
Adenomas						
≥6 mm	98.4	(90.2-99.9)	61/62	91.9	(81.5-97)	57/62
6-9 mm	97.1	(83.4-99.9)	34/35	91.4	(75.8-97.8)	32/35
≥10 mm	100.0	(84.5-100)	27/27	92.6	(74.2-98.7)	25/27
Adenomas com HGD e/ou transf. vilosa (adenomas pré-neoplásicos)						
≥ 6mm	100.0	(88-100)	36/36	91.7	(76.4-97.8)	33/36
6-9 mm	100.0	(62.9-100)	9/9	88.9	(50.7-99.4)	8/9
≥ 10mm	100.0	(84.5-100)	27/27	92.6	(74.2-98.7)	25/27

Quadro 2.9 Distribuição dos pólipos por segmento cólico

	6-9 mm	≥ 10 mm	Totais
Cego			
Adenomatoso	0	1	1
Não adenomatoso	0	1	1
Cólon ascendente			
Adenomatoso	7	2	9
Não adenomatoso	4	3	7
Cólon transverso			
Adenomatoso	5	6	11
Não adenomatoso	3	0	3
Cólon descendente			
Adenomatoso	5	2	7
Não adenomatoso	2	0	2
Sigmoide			
Adenomatoso	13	12	25
Não adenomatoso	9	0	9
Reto			
Adenomatoso	5	4	9
Não adenomatoso	4	0	4
Totais	57	31	88
Adenomatoso	35	27	62
Não adenomatoso	22	4	26

2.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste estudo, a CV ponderada por teleradiologia provou ser eficiente no rastreio dum coorte de 510 indivíduos de risco médio para o CCR, habitantes do Arquipélago da Madeira, com cerca de 250.000 habitantes. A amostra reflete as características populacionais dos grupos etários estudados, em termos de idade, sexo e distribuição geográfica pelos concelhos da RAM, mimetizando os dados percentuais obtidos pelo censo de 2011.

A CV evidenciou um poder diagnóstico robusto com um alto grau de previsibilidade para a presença ou ausência de doença¹⁷. A CV diagnosticou todos os casos com lesões pré-neoplásicas ≥ 6 mm e 98.1% de indivíduos com adenomas ≥ 6 mm. Na base do diagnóstico por pólipos, a sensibilidade foi de 100% para os pólipos pré-neoplásicos e 98.4% para adenomas ≥ 6 mm. A CV detetou mais adenomas ≥ 6 mm do que a CO e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.04$).

É em geral aceite que estes bons índices só são conseguidos quando o estado da arte da técnica de colonografia por tomografia computadorizada (CV) é aplicado por radiologistas experientes na sua execução e na sua leitura⁶. Neste rastreio, estas condições foram conseguidas através do uso da teleradiologia que permitiu o envio das imagens, obtidas no Funchal, para um centro belga de excelência.

Apesar da CV já ter sido considerada precisa no rastreio do cancro colorretal²⁻⁵, a avaliação da sua performance através do uso da teleradiologia para leitura das imagens, tanto quanto sabemos nunca foi averiguada no contexto de um estudo de rastreio, com o departamento radiológico local apenas realizando a execução da técnica. A decisão de assim termos procedido tem subjacente o princípio da benevolência, no sentido de podermos ultrapassar dificuldades logísticas locais, se a estratégia demonstrar eficácia na ultrapassagem de tais dificuldades. Esta decisão, associada à utilização da CO como exame de comparação em todos os indivíduos, permitiu-nos chegar a importantes observações. Em primeiro lugar, no presente estudo, a CV atingiu uma alta sensibilidade utilizando um aparelho de TC de 6 cortes e com interpretação primária 3D. Isto corrobora os resultados de Pickhardt e colaboradores², confirmando que não é mandatória a existência de *hardware* de TC de alta tecnologia. Associadamente, a interpretação 3D parece ser crucial para obter bons resultados. Além disso, demonstrámos que a CV tem grande sensibilidade para lesões 6-9 mm. Em segundo lugar, a teleradiologia permitiu uma deteção fidedigna e segura de lesões polipóides por radiologistas experientes localizados a grande distância. Isto sublinha o grande potencial da teleradiologia na disseminação desta subespecialidade²⁰ e torna acessível a utilização da CV como mais uma opção no rastreio do CCR em locais com experiência insuficiente com a técnica, mesmo que

localizados em áreas remotas^{18,19}. Alternativamente, a teleradiologia pode ser utilizada quer como guia durante a curva de aprendizagem do jovem radiologista local, quer como meio de obtenção duma avaliação por especialista credenciado em problemas locais de diagnóstico difícil. Em terceiro lugar, a CV avaliou melhor que a CO e apresentou uma capacidade significativamente maior do que a CO de detetar um adenoma ≥ 6 mm (98.4% versus 91.9%, respetivamente), e esta diferença seria ainda maior se tivéssemos tido em conta os resultados da CV de revisão. O desconhecimento dos resultados prévios da CV durante a realização da CO (*absence of segmental unblinding* na designação inglesa) pode ter tido uma influência prejudicial, eliminando o incentivo psicológico da pressão de não visualização duma lesão descrita pelo exame anterior^{2,21,22}. Finalmente, uma mais baixa sensibilidade da CO na deteção de lesões do cólon direito é um fenómeno conhecido²³⁻²⁶. Combinando os cinco adenomas não diagnosticados pela CO com as 14 lesões confirmadas pela CV de revisão, 13 em 19 (68.4%) das lesões estavam localizadas no cólon direito.

Vários estudos têm demonstrado esta dificuldade de diagnóstico de lesões do cólon direito pela CO. Hewett e Rex reexaminaram o cólon ascendente e o cego com o colonoscópio em retroflexão após uma CO inicial em 1000 indivíduos. Encontraram taxas de 4 e 12% de não diagnóstico, respetivamente, em adenomas 6-9 mm e ≥ 10 mm do cólon proximal²⁷. Em 1731 pacientes submetidos a CO de revisão um ano após a CO inicial, Laiyemo e colaboradores demonstraram que as lesões não detetadas ocorreram sobretudo no cólon proximal, sublinhando a importância duma inspeção meticulosa deste segmento²⁸.

Os resultados do presente estudo são consistentes com os de uma meta-análise recente na deteção do CCR pela CV, em que num total de 11151 pacientes se obteve uma sensibilidade de 96.1%²⁹. Além disso, de acordo com esta meta-análise, a sensibilidade para o cancro foi de 100% se os doentes tivessem sido preparados devidamente com catárticos e corantes fecais. Os autores concluíram que a CV poderia complementar a CO na deteção de cancros do cólon direito. Os dados do presente estudo também demonstraram que sempre que a CV deteta uma lesão com grande probabilidade, todos os esforços devem ser feitos para que a CO confirme o achado. Nos casos negativos, estes indivíduos devem ser propostos para *follow-up* adequado.

Este estudo teve várias limitações. Uma delas foi a relativa falta de consistência do teste padrão, a CO, traduzida pelos casos positivos de CV confirmados posteriormente, quer pela própria CO, quer por cirurgia, fatos indiciadores que algumas lesões não terão sido detetadas por ambos os exames.

Não foi feita uma caracterização das lesões diminutas (< 6 mm) e no sentido da identificação

das lesões planas (≤ 3 mm na CV e $\leq 2,5$ mm na CO). Não se considerou relevante a sua individualização porque no contexto de rastreio deve-se priorizar lesões com período de latência relativamente longo.

Mas neste estudo, a prevalência de adenomas e de pólipos pré-neoplásicos é comparável a outros coortes de rastreio^{3,4}. De fato, a prevalência é até mais alta, se tivermos em conta os resultados da CV de revisão.

O envolvimento de mais Centros de Leitura de CV teria com certeza dado outra robustez ao estudo. Também provavelmente será necessário um estudo comparativo de leituras efetuadas localmente com leituras efetuadas por um centro de referência, que enalteça a melhoria da qualidade introduzida pelo uso da teleradiologia. Contudo, vários estudos prévios já provaram, suficientemente, a importância da experiência, donde se pode deduzir que a leitura feita por experientados através da teleradiologia ultrapassa em qualidade a leitura local feita por jovens radiologistas com pouca experiência^{6,30}.

Face à variabilidade de resultados, o uso em grande escala da CV na prática clínica diária é difícil, tendo em vista o treino intensivo necessário que obriga a um grande *turnover* de rastreados. Além disso, na maioria dos países este método não tem ainda participação das instituições públicas ou das companhias seguradoras, o que tem conduzido a pouca procura, utilização inadequada e resultados pouco satisfatórios^{7,8}.

A teleradiologia oferece a oportunidade do acesso remoto a centros de excelência com radiologistas experientes^{9,10,61}, conseguindo-se bons resultados na deteção de pólipos com exames realizados em regiões periféricas, tal como efetuado no presente estudo^{11,13}. A CV está pronta para ser aplicada no rastreio em massa das populações sendo necessários resultados robustos de estudos multicêntricos que o confirmem.

Satisfação com os exames de Colonoscopia

3. SATISFAÇÃO COM OS EXAMES DE COLONOSCOPIA

3.1 – INTRODUÇÃO

Em Portugal não há o hábito de medir a satisfação dos pacientes com os exames médicos. Na área dos diversos exames colonoscópicos desconhecemos mesmo qualquer trabalho nacional ou internacional. A pesquisa bibliográfica conduz-nos invariavelmente para a análise de graus de satisfação com os serviços, atos médicos e com a perceção de doença, e não com as áreas de exames médicos propriamente ditos ^{1-3,5,6,8,11,15,17,19,21}.

Começa a haver interesse e perceção da necessidade de se realizarem estudos neste campo, numa área de grande interesse em Saúde Pública, dada a evolução exponencial das incidência e prevalência do CCR na população ocidental. A atualidade e interesse desta questão foi assinalada pela apresentação dum trabalho sobre satisfação com os exames de colonoscopia: *Screening CT Colonography: Multicenter Survey of Patient Experience, Preference and Impact on Adherence*, pelo grupo de trabalho do Professor Pickhardt no Congresso de 2011 da Radiological Society of North America (RSNA) (97º Congresso, Chicago).

Tanto na área da Clínica Médica como na área da Psicologia da Saúde verificamos um vazio na aplicação destes questionários de satisfação face aos diferentes exames das diversas especialidades médicas²⁵.

O conceito de satisfação tem sido mais desenvolvido na área da Psicologia Social, quer em relação ao consumo, quer às diferentes áreas de desempenho profissional, donde parte, portanto, a sua conceptualização. Pode definir-se satisfação a partir do produto, como sendo o nível de sentimento dum pessoa, tradutor das suas expectativas em relação a esse produto, ou então a partir do estado cognitivo de adequação ou inadequação do produto às necessidades do sujeito ¹⁴.

O estado emocional pode também constituir uma medida para se classificar as diferentes formas de se obter satisfação. Oliver et al ¹⁴ propõe quatro reações-tipo face ao produto:

- a) Contentamento, quando o consumidor conhece o resultado, mantendo o mesmo nível de satisfação;
- b) Prazer, quando o consumidor busca o prazer e o obtém, tornando-se mais satisfeito;
- c) Encantamento, quando os resultados do processo de comparação ocorrem

acima das expectativas, tornando o consumidor extremamente satisfeito;

- d) Alívio, quando o consumidor deixa de estar insatisfeito.

Na conceptualização da satisfação pode-se identificar na literatura quatro grandes teorias:

- 1) Teoria da desconfirmação das expectativas (*The Disconfirmation Paradigm*, de Weaver e Brickman, 1974) ²², cuja ideia central parte do pressuposto que um indivíduo cria uma expectativa em relação a um determinado elemento (produto, serviço, relacionamento, etc.), posteriormente percebe que o facto real ocorreu (o desempenho) e faz uma comparação entre a expectativa e a sua percepção. Ao fazer esta comparação, o sujeito pode ou não confirmar as suas expectativas, sendo a distância entre a expectativa e a percepção aquilo que leva ao sentimento de satisfação ou insatisfação;
- 2) Teoria da atribuição (Bitner, 1990) ⁷, em que a atribuição é o que as pessoas percebem como sendo a causa do seu comportamento, do comportamento dos outros ou dos eventos observados (Almeida 1999). Quando o indivíduo se sente satisfeito, tende a atribuir a responsabilidade a si mesmo. Porém, quando ocorre insatisfação, a maior probabilidade é que responsabilize os agentes externos em maior ou menor grau. Weiner (1985) ²⁰ classifica essa responsabilização em três dimensões:
 - a) A fonte do problema, interna ou externa;
 - b) O controlo (houve intenção de provocar o problema?);
 - c) A estabilidade (foi uma ocorrência isolada ou tende a repetir-se?);
- 3) Teoria da equidade (*Equity Theory*) ^{23,24}, em que a satisfação surge quando um indivíduo percebe que o seu esforço para adquirir um produto ou serviço está em equilíbrio com o que lhe é dado.

Da conjunção da teoria da equidade com a teoria da atribuição, o nível de satisfação ou insatisfação está fortemente enraizado nos sentimentos positivos e negativos que o consumidor associa ao produto – gerando a *Teoria da afetividade*;

- 4) Teoria da dissonância cognitiva (Festinger 1975)¹⁰, baseia-se na incompatibilidade que pode surgir da percepção que o indivíduo tem de duas ou mais das suas atitudes ou entre o seu comportamento e as suas atitudes. Sendo

que a dissonância provoca incómodo, esta pode ser desencadeada quando o indivíduo não percebe como justa a comparação entre o produto e o seu valor.

Ao analisarmos a satisfação, tomando como produto os exames médicos de colonoscopias, procurámos avaliar as seguintes dimensões:

- a) Expetativas dos sujeitos em relação à CO e à CV;
- b) Sentimentos desencadeados por estas;
- c) Perceção da eficácia das mesmas;
- d) Importância da informação que se tem dos exames;
- e) Avaliação comparativa das duas colonoscopias.

Tal como referimos anteriormente, a ausência de instrumentos que nos permitissem avaliar a dimensão da satisfação com ambos os exames colonoscópicos, obrigou-nos à necessidade de criar, em primeiro lugar, uma Escala de Satisfação com os Exames de Colonoscopias (ESEC) - Estudo 1, para sequencialmente estudarmos a reação dos participantes aos exames, aplicada por Psicólogas, cerca de 30 minutos após a realização de ambos os exames clínicos.

3.2 ESTUDO 1 - ANÁLISE FATORIAL DE COMPONENTES PRINCIPAIS DO QUESTIONÁRIO DE SATISFAÇÃO COM OS EXAMES DE COLONOSCOPIAS (ESEC)

A ESEC foi construída para a realização deste trabalho de investigação. A necessidade de construção e utilização de uma escala de satisfação no estudo justifica-se, uma vez que, na opção pelo exame de rastreio a utilizar, a controvérsia é enorme porque nenhum dos testes é ideal. Além disso, nos critérios de seleção do exame de rastreio, há que ter em conta, não só a eficácia de cada um dos testes dum ponto de vista médico, mas também o seu impacto dum ponto de vista psicológico.

A ESEC tem como principal objetivo compreender a satisfação que os indivíduos sujeitos a exames de CO ou CV têm em relação a cada uma das técnicas, a preferência que têm entre elas, assim como compreender a ansiedade e receios dos indivíduos a estes exames. A ESEC continha inicialmente 27 itens (Anexo 8), ponderados numa escala de Likert de 4 pontos (1=discordo muito, 2= discordo, 3= concordo, 4= concordo muito). Procurou-se que a escala medisse todos os aspetos ligados aos exames, desde os aspetos dolorosos, à eficácia das técnicas, à ansiedade e medos, à informação que se tem dos exames e a importância que esta tem para a realização destes.

Os itens foram formulados tanto na positiva como na negativa, tendo sempre o cuidado da formulação ser idêntica para as técnicas, por exemplo, o item 5 “Não me custou fazer o exame de CO” e o item 7 “Não me custou fazer o exame de CV”, ou o item 8 “Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de CV” e o item 21 “Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de CO”. Teve-se igualmente o cuidado de que os itens fossem desalinhados de modo a não serem seguidos itens que avaliassem o mesmo exame ou o mesmo aspeto, em ambos os exames. Começou-se primeiro por perguntas mais ligeiras, como o item 1 “Foi fácil fazer a preparação para estes exames” ou o item 2 “Não senti qualquer efeito da medicação usada para me preparar para estes exames”, para depois se passar para itens de maior profundidade, como o item 11 “Enquanto estive a fazer o exame de CV tive pensamentos negativos” ou o item 14 “Tive receio quando me estavam a fazer o exame de CO”.

3.2.1 Amostra e Metodologia

Para a validação desta escala analisaram-se os primeiros 426 sujeitos, 257 do sexo feminino

(60.3%) e 169 do sexo masculino (39.7%), com idades compreendidas entre os 50 e os 74 anos ($M = 60.5$ e $DP = 6.5$). Os participantes foram primeiro submetidos ao exame de CV e depois ao exame de CO. Findos os exames médicos, descansaram pelo menos 30 minutos e só depois responderam à escala de satisfação. A ESEC foi aplicada por técnicos licenciados em psicologia e especificamente treinados para trabalhar com a escala. Em primeiro lugar eram lidas as instruções de aplicação da escala aos participantes e depois o técnico lia em voz alta cada uma das questões e registava as respostas. Sempre que necessário foram prestados os esclarecimentos solicitados pelos participantes.

3.2.2 Apresentação dos resultados relativos à validade

Para o exame da validade de constructo procedemos à análise fatorial de componentes dos itens. Previamente à análise fatorial calculamos o coeficiente KMO. O valor de KMO de 0,804 permite-nos concluir da boa qualidade das correlações entre os itens que formam o questionário. Estavam reunidas as condições para a aplicação da análise fatorial.

Da análise de componentes principais, seguida de rotação varimax, obtiveram-se 9 dimensões, mas apenas analisamos as cinco primeiras dimensões que explicam 60.29% da variância total.

A primeira dimensão explica 16.05% da variância, e engloba 4 itens (itens 3, 5, 10 e 19), relacionados com aspectos positivos do exame de CO e que podemos denominar por *satisfação com o exame de CO* (Quadro 3.1).

Quadro 3.1 Itens que compõem a primeira dimensão: Satisfação com a CO

19.	O exame de CO não é doloroso de fazer
5.	Não me custou fazer o exame de CO
3.	Senti-me bem enquanto durou o exame de CO
10.	Prefiro fazer o exame de CO do que o de CV

A segunda dimensão compreende 5 itens (itens 4, 8, 16, 21 e 26), que se relacionam com a ansiedade com que os sujeitos enfrentam este tipo de exames médicos (12.9 % da variância), e por isso se designa *ansiedade face aos exames* (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 Itens que compõem a segunda dimensão: Ansiedade face à CV e à CO

21.	Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de CO
4.	Estava nervoso quando estava à espera que me chamassem para estes exames
16.	Não vinha descontraindo quando vim para estes exames
8.	Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de CV
26.	Pensei em muitas coisas enquanto esperava para realizar estes exames

A terceira dimensão junta 3 itens (itens 15, 7 e 18) relacionados com os aspetos negativos da CV (12.3 % da variância), e que podemos denominar como *Satisfação com a CV* (Quadro 3.3).

Quadro 3.3 Itens que compõem a terceira dimensão: Satisfação com a CV

15.	O exame de CV não é doloroso de fazer
7.	Não me custou fazer o exame de CV
18.	Senti-me bem enquanto durou o exame CV

A quarta dimensão, com 4 itens (itens 11, 14, 20 e 25), congrega aspetos relacionados com os medos em relação a estes exames médicos (10.6 % da variância), e por tal designada *receios face aos exames* (Quadro 3.4).

Quadro 3.4 Itens que compõem a quarta dimensão: Receios face à CV e à CO

25.	Enquanto estive a fazer o exame de CO tive pensamentos negativos
11.	Enquanto estive a fazer o exame de CV tive pensamentos negativos
20.	Tive receio quando me estavam a fazer o exame de CV
14.	Tive receio quando me estavam a fazer o exame de CO

Por último, a quinta dimensão conta com 2 itens (itens 9 e 13), ligados à eficácia das técnicas, e pode ser por isso denominada *percepção da eficácia das técnicas* (8.44 % da variância) (Quadro 3.5).

Quadro 3.5 Itens que compõem a quinta dimensão: Percepção da eficácia da CV e da CO

13.	Acho que o exame de CV é eficaz
9.	Acho que o exame de CO é eficaz

As restantes quatro dimensões encontradas, apesar de contribuírem para compreender a variância da resposta dos sujeitos, quando se foi analisar a consistência destes agrupamentos verificou-se que a mesma era baixa (alphas de Cronbach ≤ 0.6), pelo que optou-se por retirá-las da escala. Assim, foram excluídos 8 itens (item 1, 2, 6, 12, 17, 22, 23 e 27) (Quadro 3.6).

Quadro 3.6 Itens retirados da escala

1.	Foi fácil fazer a preparação para estes exames
2.	Não senti qualquer efeito da medicação usada para me preparar para estes exames
6.	Compreendi bem as instruções que me foram dadas para me preparar para este exame
12.	As instruções que o médico me deu enquanto fazia os exames foram importantes para me relaxar
17.	Ter ar nos intestinos não me incomodou na CO
22.	Sabia o suficiente sobre os exames antes de os realizar
23.	A informação sobre o que nos vão fazer durante os exames é importante
27.	Ter ar nos intestinos não me incomodou na CV

3.2.3 Dados relativos à precisão

Para a análise da coerência existente nas respostas dos sujeitos aos itens da ESEC, foi usado o coeficiente alfa de Cronbach. Na análise feita a cada uma das dimensões encontradas, os valores obtidos são aceitáveis ($0.63 < \text{alfa Cronbach} < 0.79$). Apesar da precisão considerada apropriada ser superior a 0.7, certos autores, como DeVellis (1991, citado por Maroco & García-Marques, 2006) ¹² consideram que em “cenários de investigação das ciências sociais, um alfa de 0.60 é aceitável, desde que os resultados obtidos com esse instrumento sejam interpretados com precaução (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Valores do alfa de Cronbach das diferentes dimensões

Dimensão	Alpha de Cronbach
Satisfação com a CO	0.79
Ansiedade face aos exames médicos	0.72
Satisfação com a CV	0.67
Receios face aos exames médicos	0.63
Perceção da eficácia dos exames médicos	0.67

3.3 ESTUDO 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DE COMPONENTES PRINCIPAIS DO QUESTIONÁRIO DE SATISFAÇÃO COM OS EXAMES DE COLONOSCOPIAS (ESEC)

3.3.1 Amostra

A amostra deste estudo é constituída por 496 sujeitos, 295 do sexo feminino (59.5%) e 201 do sexo masculino (40.5%), com idades compreendidas entre os 50 e os 74 anos de idade (média= 60.24, sd= 6.44), recrutados aquando da participação no rastreio do CCR.

3.3.2 Procedimentos

À semelhança do primeiro estudo, a ESEC foi aplicada por técnicos de psicologia, meia hora após a realização de ambos os exames médicos. As instruções das escalas e as perguntas eram lidas aos participantes pelo técnico e as respostas anotadas pelos mesmos. Quando necessário foram prestados os esclarecimentos solicitados pelos participantes.

3.3.3 Apresentação dos resultados

3.3.3.1 Estatística Descritiva

A leitura dos resultados foi feita tendo em conta as cinco dimensões da escala de ESEC (Tabela 3.2).

Em relação à satisfação com o exame de CO podemos afirmar que os indivíduos estão divididos, pois se a tendência dos participantes (moda =4) é afirmar que não é doloroso realizar este exame, a maioria 54.1 % discorda ou discorda muito com esta afirmação. De igual modo, apesar de 52.5% dos participantes afirmarem não ter sido custosa a realização da CO, e ser esta a principal tendência (moda= 4), uma grande percentagem (47.5%) discorda ou discorda muito desta afirmação. Já a maioria dos participantes (37.9%, moda =1), prefere não fazer a CO em detrimento do exame de CV. Em relação à CO, os participantes só são mais unânimes ao afirmarem terem-se sentido bem a realizar este exame (44.2%, moda=4).

Tabela 3.2 Mediana, moda, percentis, percentagens itens da ESEC agrupados pelas escalas

Dimensões	Questões	N	Mediana	Moda	Percentis		Percentagem			
					25	75	Discordo muito	Discordo	Concordo	Concordo muito
Satisfação com a CO	O exame de CO não é doloroso de fazer	496	2	4	2	4	22,0	32,1	13,7	32,3
	Não me custou fazer o exame de CO	496	3	4	2	4	16,7	30,8	20,2	32,3
	Senti-me bem enquanto durou exame CO	496	3	4	2	4	11,1	17,1	27,6	44,2
	Prefiro fazer o exame de CO do que o CV	496	2	1	1	3	37,9	17,5	20,2	24,4
Satisfação com CV	O exame de CV não é doloroso de fazer	496	3	4	2	4	4,8	29,0	18,3	47,8
	Não me custou fazer o exame de CV	496	3	2	2	4	8,9	36,1	23,2	31,9
	Senti-me bem enquanto durou exame CV	496	4	4	3	4	3,0	11,1	30,8	55,0
Ansiedade face à CV e à CO	Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de CO	496	1	1	1	3	54,8	12,1	25,0	8,1
	Estava nervoso/a quando estava à espera que me chamassem para estes exames	496	2	1	1	3	48,2	9,5	29,2	13,1
	Não vinha descontraído quando vim fazer estes exames	496	1	1	1	2	59,3	20,0	13,1	7,7
	Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de CV	496	2	1	1	3	46,4	10,5	32,3	10,9
	Pensei em muitas coisas enquanto esperava para realizar estes exames.	496	1	1	1	2	65,5	11,7	14,1	8,7
Receios face à CV e à CO	Enquanto estive a fazer o exame de CO tive pensamentos negativos	496	1	1	1	1	82,7	8,3	6,5	2,6
	Enquanto estive a fazer o exame de CV tive pensamentos negativos	496	1	1	1	1	81,5	8,7	7,5	2,4
	Tive receio quando me estavam a fazer o exame de CV	496	1	1	1	1	78,0	8,5	11,5	2,0
	Tive receio quando me estavam a fazer o exame de CO	496	1	1	1	3	64,1	9,7	19,4	6,9
Eficácia CV e CO	Acho que o exame de CV é eficaz	496	4	4	3	4	0,2	1,6	39,5	58,7
	Acho que o exame de CO é eficaz	496	4	4	3	4	0,4	0,4	27,2	72,0

Já em relação ao exame de CV, os participantes parecem ser mais unânimes: 66.1% (moda =4) afirmam concordar ou concordar muito que este exame não é doloroso de ser efetuado, e 85.8% concorda ou concorda muito que se sentiram bem na sua realização. Apesar da maior tendência (moda=2), ter sido a de afirmar que não concordavam que o exame da CV não custou fazer, a maioria dos participantes (55.1%) concorda ou concorda muito que não custou fazer este exame.

Os participantes nos diferentes itens que se relacionam com a ansiedade face aos exames dizem não ter sentido ansiedade com a realização destes (moda=1, em todos os itens, 48.2%-65.5%). O mesmo se passa em relação aos medos, a maioria nos itens relacionados com este assunto diz não ter tido receios durante os exames (moda=1, em todos os itens, 64.1% - 82.7%).

Os participantes percebem ambos os exames como sendo eficazes (moda=4), sendo que 58.7% e 72.0% destes entendem a CV e a CO como exames eficazes, respetivamente.

Se optarmos por fazer uma média dos itens para as duas primeiras dimensões como indicativas da satisfação com os exames da CO e da CV, vemos que a média para a dimensão 1 (satisfação com o exame de CO) é de 2.6, o que pode indicar que os participantes estão satisfeitos com o modo como correu a realização deste exame. Da mesma maneira, a média dos itens da segunda dimensão (média=2.8), satisfação com o exame de CV, indica que os participantes também estão satisfeitos com este exame.

3.3.3.2 Satisfação em relação à CO e CV

A análise de satisfação CO e CV com a aplicação de teste T - Student para amostras emparelhadas (Tabela 3.4), mostra que existem diferenças significativas entre estes dois exames ($t = -6.17$, $p = 0.00$), sendo que o exame de CV apresenta uma média de satisfação mais elevada, permitindo dizer que os participantes estão mais satisfeitos com este exame.

Tabela 3.3 Análise comparativa da satisfação com CO e CV com teste T - Student para amostras dependentes

	Paired Differences					t	df	Sig. (2 tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Satis CO Satis CV	-.24081	.80553	.03903	-.31752	-.16409	-6.170	425	.000

SD - desvio padrão, Mean - média, t - valor de teste T-Student, df - graus de liberdade, Sig. - significância

3.3.3.3 Influência das variáveis género, idade e estatuto socioeconómico

Nesta seção analisou-se a forma como o género, a idade e o estatuto socioeconómico dos participantes são ou não importantes para compreendermos a satisfação com os exames de CO ou de CV, e as ansiedades e receios que manifestam em relação a ambos os exames. Achámos importante analisar estas variáveis para podermos avaliar da possibilidade de homogeneização dos exames.

No que diz respeito ao género verificámos que este influencia a forma como os participantes avaliam a sua satisfação com a CO, assim como a ansiedade e receio que têm em relação aos dois exames (Tabela 3.4). Ambos os géneros encontram-se mais satisfeitos com a CV do que com a CO, sendo que os homens dizem-se estar mais satisfeitos com a CO, enquanto que as mulheres manifestam mais ansiedade e receios em relação a ambos os exames.

Tabela 3.4 Média, desvio padrão e T - Student da satisfação com a CO ou com a CV, da ansiedade, receio e eficácia da CO e da CV, em função do gênero

Dimensões	Feminino		Masculino		t	df	Sig. (2-tailed)
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão			
Satisfação CO	2.4237	.87172	2.9826	.81299	-7.202	494	.000
Satisfação CV	3.0859	.73113	3.0796	.70021	.095	494	.924
Ansiedade CV e CO	1.9329	.73083	1.7841	.70267	2.261	494	.024
Receio CV e CO	1.4653	.57316	1.3433	.51509	2.423	494	.016
Eficácia CV e CO	3.6525	.45601	3.6144	.42935	.936	494	.350

DP - desvio padrão, M - média, t - valor de teste T-Student, df - graus de liberdade, Sig. - significância

Para a análise da idade, foram definidas categorias com intervalo de 5 anos, de modo a termos uma distribuição homogênea dos sujeitos por cada uma delas. A variável idade parece só influenciar a forma como os participantes estão satisfeitos com o exame de CO, verificando-se que os participantes mais jovens (idade < a 55 anos) parecem estar menos satisfeitos com este exame (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 Média, desvio padrão e T - Student da satisfação com a CO ou com a CV, da ansiedade, receio e eficácia da CO e da CV, em função da idade (anos)

Dimensões	<55		55-59		60-64		65-69		70-74		ANOVA	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	F.	Sig.
Satisfação CO	2.68	0.84	2.78	0.93	2.74	0.92	2.47	0.85	2.44	0.93	2.460	.032
Satisfação CV	2.01	0.72	1.86	0.72	1.91	0.71	1.94	0.76	1.85	0.66	2.061	.069
Ansiedade CV e CO	1.75	0.69	1.86	0.71	1.99	0.73	1.96	0.76	1.77	0.68	1.792	.113
Receio CV e CO	1.30	0.43	1.45	0.58	1.48	0.64	1.48	0.57	1.46	0.52	2.183	.055
Eficácia CV e CO	3.64	0.44	3.65	0.44	3.66	0.41	3.63	0.50	3.59	0.46	.358	.877

DP - desvio padrão, M - média, F - teste de Fisher, Sig. - significância

No estudo do estatuto socioeconómico utilizamos a escala de Graffar (1956) (anexo 9). Parece não influenciar nem a satisfação com ambos os exames (CO ou CV) nem a ansiedade, receios e eficácia dos mesmos (CO e CV) (Tabela 3.6)

Tabela 3.6 Média, desvio padrão e T Student da satisfação com a CO ou com a CV, da ansiedade, receio e eficácia da CO e da CV, em função do estatuto sócioeconómico

Dimensões	Classe I		Classe II		Classe III		Classe IV		ANOVA	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	F	Sig.
Satisfação CO	2.45	0.81	2.67	0.87	2.74	0.90	2.61	0.91	1.35	0.26
Satisfação CV	2.01	0.70	1.93	0.69	1.90	0.78	1.89	0.69	0.34	0.80
Ansiedade CV e CO	1.69	0.65	1.88	0.64	1.83	0.75	1.95	0.76	1.82	0.14
Receio CV e CO	1.29	0.36	1.41	0.54	1.40	0.58	1.45	0.57	1.04	0.38
Eficácia CV e CO	3.53	0.47	3.62	0.43	3.65	0.49	3.67	0.41	1.26	0.29

DP - desvio padrão, M - média, F - teste de Fisher, Sig. - Significância

3.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como já referido, a ausência de instrumentos específicos impôs que tivéssemos de construir uma escala de avaliação da satisfação para as colonoscopias. Depois de sucessivas avaliações críticas que impuseram a eliminação de alguns itens incluídos no modelo inicial, adoptamos como instrumento para este objetivo específico a escala apresentada na Tabela 3.2, que inclui a análise de resultados obtidos, de acordo com variáveis valorizadas pelos modelos teóricos de satisfação 4, 5, 10, 22, 23, 24, nomeadamente a emocionalidade e a percepção da eficácia: satisfação com a CV, satisfação com a CO, a ansiedade e os receios face aos exames e a percepção da eficácia.

Os rastreios não valorizaram a informação detalhada sobre o funcionamento das técnicas, ou seja, informação mais cognitiva que lhes foi fornecida parece não ter sido preponderante para a avaliação da satisfação. Por tal, houve necessidade de retirar da escala os itens relacionados com a importância da detenção de informação sobre os exames médicos. Relativamente à precisão da escala e como já foi referido anteriormente, os resultados são apenas satisfatórios, o que nos levou a fazer sempre uma leitura cuidada das opiniões dos participantes.

Na generalidade, os indivíduos manifestaram uma valorização de ambos os exames, salientando os aspetos positivos e relativizando os aspetos negativos. Tratando-se de um rastreio gratuito e tendo em conta comentários que foram registados ao longo das entrevistas, podemos pensar que este fato enviesou as suas opiniões. Será importante em futuros estudos tentar controlar esta variável. Contudo, dado que a valorização influenciou ambos os exames, é nossa convicção que continuava a ser pertinente a leitura comparativa dos resultados. Adicionalmente, faz parte do protocolo da realização duma CO a administração de farmacoterapia redutora do mal-estar provocado pelo exame. Usou-se uma benzodiazepina hidrossolúvel, de metabolização rápida e sem metabolitos intermediários, que proporciona amnésia retrógrada, tornando-a uma droga cómoda para uso em ambulatório. Ao contrário da CO, no protocolo da CV não é utilizada qualquer medicação, razão porque, apesar do intervalo de espera de trinta minutos antes da passagem do questionário de satisfação, este fato pode também ter distorcido a opinião dos participantes. Apesar de todas estas limitações, os resultados permitem-nos concluir que existe uma tendência significativa para os rastreios estarem mais satisfeitos com a CV (Tabela 3.3).

Houve diversidade de comportamentos nos dois géneros, apesar de ambos preferirem a CV em detrimento da CO. Os homens manifestaram preferência pela CO e as mulheres referiram mais ansiedade e receios perante os dois exames. Por outro lado, os participantes mais jovens, com

idades inferiores a 55 anos, mostraram-se menos satisfeitos. Na verdade, muitos fatores podem influenciar a satisfação dos indivíduos. Várias teorias psicológicas têm sido usadas para examinar a influência das preocupações de saúde na aderência ao tratamento de várias doenças, verificando-se muitas vezes diferenças entre sexos e idades ^{1, 9, 13, 18}, pelo que neste domínio julgámos adequado apresentar alguns resultados.

Das várias teorias, o modelo de Crença sobre a Saúde (*health belief model*) ⁵ e a *teoria do comportamento planeado*⁴ têm sido as mais usadas e têm fornecido algumas informações úteis. A primeira teoria propõe que os indivíduos com preocupações de saúde sobrepõem os benefícios da sua ação ou das suas decisões à ansiedade e aos receios de possíveis complicações. No presente estudo, isto explicaria a menor resistência e a maior complacência dos homens em relação à CO. A teoria do comportamento planeado, por outro lado, descreve a ação como secundária à intensão, que por sua vez é dependente da emocionalidade e da opinião de terceiros, sendo que no nosso estudo as mulheres foram mais suscetíveis a estes fatores.

Porque a satisfação dos rastreados é fundamental para o êxito e sucesso dos rastreios em geral, e do CCR em particular, é nosso entendimento que isto seja um aspeto a estudar mais profundamente em trabalhos futuros.

**Significado epidemiológico dos Programas de Rastreio
e sua importância em Saúde Pública**

4.1 Introdução

Um dos grandes avanços na medicina contemporânea é a capacidade de previsibilidade. O estudo epidemiológico dos fatores condicionantes e determinantes do processo saúde-doença na população humana permitiu o desenvolvimento da Medicina Preventiva (prevenções primária, secundária e terciária) e de estratégias eficazes para promoção dum maior bem-estar físico-psíquico e de uma maior longevidade dos indivíduos, no âmbito da Saúde Pública. Paralelamente, o controle dos fatores de risco de doença tem permitido importantes reduções nas intervenções socioeconómicas para a diminuição da pobreza, melhoria das condições de vida e desenvolvimento do saneamento básico do meio ambiente^{1,2,3}.

A utilização de programas de rastreio eficientes e fáceis de aplicar, incruentos ou pouco cruentos, de baixo custo e bem aceites pelas populações, insere-se na estratégia de viabilização e manutenção duma política de Saúde Pública assente na previsão e no controle antecipado de eventos pré-patológicos, com grande economia dos custos sociais e financeiros. Todos os estudos de investigação que se traduzam na criação de rastreios que respondam a estes quesitos são bem-vindos, positivos e de grande utilidade.

4.2 Abordagem epidemiológica à avaliação dos programas de rastreio

Um dos campos da Epidemiologia é a avaliação da efetividade dos programas de rastreio para a deteção precoce da doença, como atividade de prevenção secundária. Deteção precoce da doença significa deteção numa fase pré-sintomática anterior àquela em que seria normalmente descoberta na prática clínica, quando o indivíduo ainda não tem queixas clínicas (sintomas e sinais) e por isso, não tem razões para procurar cuidados médicos. Ao realizarem-se rastreios assume-se que existe uma intervenção apropriada, e que podem ser tanto mais eficazes se a doença for detetada numa fase precoce, e se vários quesitos, adiante descriminados, forem satisfatoriamente resolvidos.

4.2.1 História natural da doença

Para discutir as questões metodológicas da avaliação dos benefícios do rastreio, temos que analisar detalhadamente a história natural da doença^{3,4}, esquematizada na Figura 4.1. O período que antecede o início biológico da doença, em que o indivíduo é saudável/sem a doença, deve ser aproveitado para a prevenção primária (controle dos fatores de risco, eliminação das causas geradoras de doença, imunização). No seu início biológico, molecular ou celular, a doença é ainda indetetável, o que corresponde à fase pré-clínica, de duração variável. O aparecimento dos primeiros sinais e sintomas indiciam o avanço para a fase clínica, também de duração variável, e durante a qual ocorre o diagnóstico e o início do tratamento apropriado.

Durante a fase pré-clínica, a partir de um certo momento a doença é detetável por um teste de rastreio. O tempo que medeia desde o diagnóstico por rastreio até ao aparecimento dos primeiros sintomas denomina-se fase pré-clínica detetável da doença (período da prevenção secundária). Quando a doença é detetável por rastreio, o diagnóstico é deslocado para um ponto anterior na história natural da doença. Esta *antecipação* (*lead time*) define-se como o intervalo de adiantamento do momento habitual do diagnóstico. Outro conceito importante em rastreio é o de *pontos críticos* da história natural da doença, antes dos quais o tratamento é mais efetivo, menos difícil de administrar e a doença é provavelmente curável. O ponto crítico é um conceito teórico difícil de localizar na história natural da doença, mas é o fundamento do rastreio e da deteção precoce.

Há um benefício potencial do rastreio, se assumirmos que a maior parte dos casos clínicos passam por uma fase pré-clínica detetável e que na ausência de intervenção na fase pré-clínica, progridem para a fase clínica. Aliás, não há indicação para efetuar testes de rastreio periódicos se: i) nenhum dos casos pré-clínicos evoluir para a fase clínica; ii) nenhum dos casos clínicos passar por uma fase pré-clínica; iii) a fase pré-clínica for tão curta que é pouco provável que a doença seja detetada; iv) ocorrer regressão espontânea das doenças, sem evolução para a fase clínica.

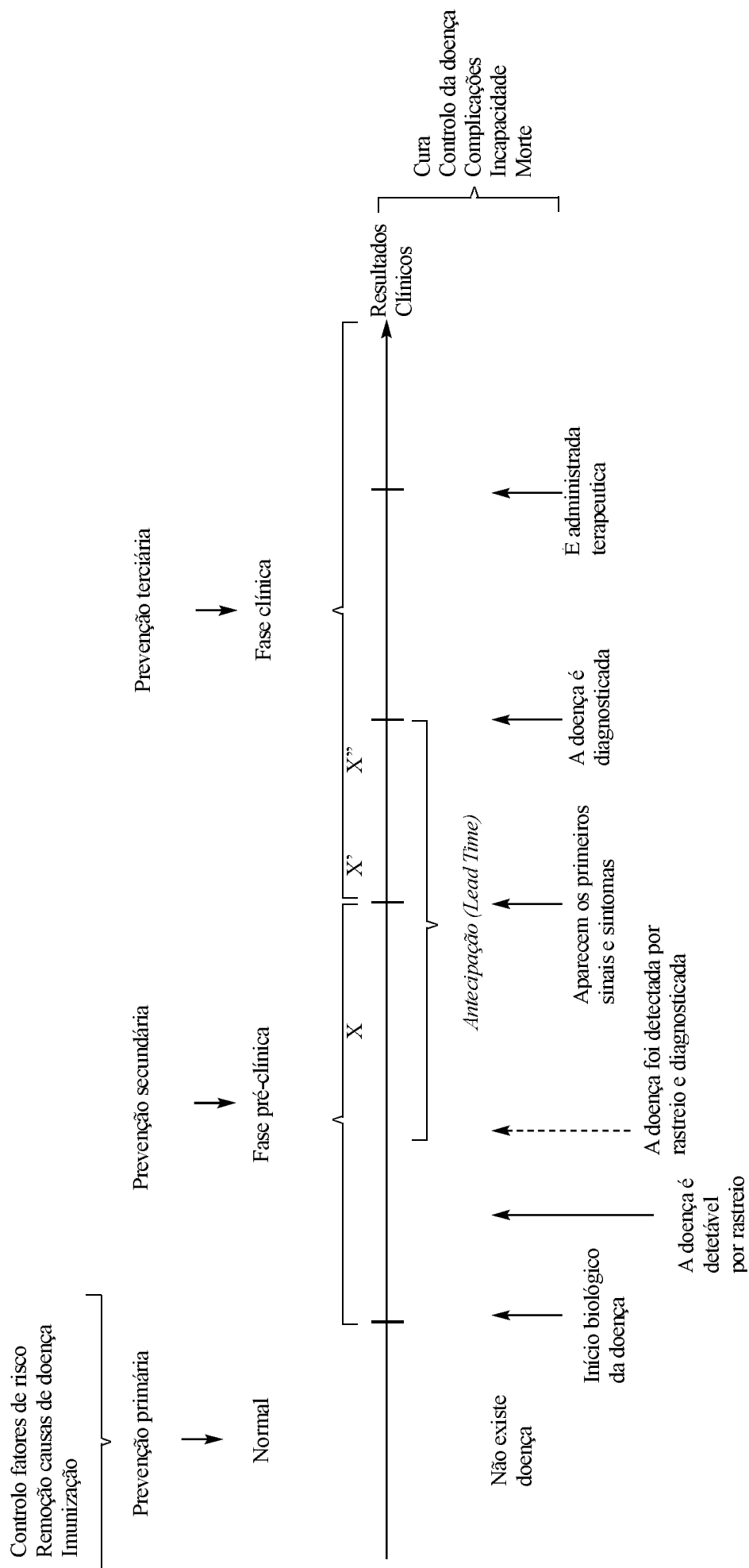


Figura 4.1 Representação esquemática da história natural da doença e metodologia de intervenção (X, X', X'' - Pontos críticos) (baseado em Gordis L)³

4.2.2 Desenho de estudos para avaliação de rastreios^{2,3}

Estudos aleatorizados

São os de maior relevância epidemiológica e os que fornecem maior grau de evidência clínica, além de nivelarem os resultados de estratos sociais e raciais diversos. Da amostra populacional selecionada aleatoriamente, metade é submetida a rastreio e a outra metade não é rastreada. São dispendiosos, difíceis de preparar e na prática, difíceis de implementar.

Estudos não aleatorizados coorte

A maioria dos estudos de programas de rastreio usa um *desenho de coorte*, em que um grupo de pessoas rastreadas é comparado com um grupo de pessoas não rastreadas. Podem apresentar vários vieses. O viés de voluntarismo é um viés de seleção criado por indivíduos ansiosos, mas motivados e sobreavaliados medicamente, que se oferecem frequentemente para participar nestes projetos. Por isso, a comparação entre participantes e não participantes não é geralmente uma estratégia aconselhável para avaliação dum teste de rastreio. Outro viés é a possibilidade dos testes detetarem doenças de melhor prognóstico por terem fases pré-clínica e clínica mais longas que as de pior prognóstico. Em oposição, aparecem *casos de intervalo* que escapam aos testes de rastreio regulares. Estes evidenciam uma progressão rápida e agressiva da doença, com fases pré-clínica e clínica curtas e alta letalidade. O viés de antecipação do diagnóstico por rastreio pode determinar falsas sobrevivências aos cinco anos (a sobrevivência no grupo de rastreio tem que ser superior à sobrevivência do grupo de controlo, adicionada ao período de antecipação). Outro enviesamento potencial é o do sobrediagnóstico, devido ao entusiasmo de quem executa o rastreio e que conduz a uma taxa alta de falsa positividade, e consequentemente, a uma estimativa inflacionada de sobrevivência.

Estudos não aleatorizados caso-controlo

Tem-se utilizado também o *desenho caso-controlo*, em que indivíduos com doença avançada (*casos*), rastreados e não rastreados anteriormente, são comparados com indivíduos com doença inicial ou sem doença, (*controles*), rastreados ou não rastreados anteriormente e provenientes da mesma população dos casos avançados. Avaliamos a história de realização do rastreio tanto nos casos avançados como nos controlos, e este será efetivo se tiver uma maior prevalência nos controlos, com uma razão de possibilidades (*odds ratio*) e respetivo intervalo de confiança a 95% inferiores a 1.0.

4.3 Avaliação da validade e fiabilidade dos testes de rastreio^{2,3}

Quando avaliamos uma determinada população, não sabemos quem tem ou quem não tem doença, e se esta dicotomia já estivesse estabelecida os testes deixariam de ter sentido. Para determinarmos quantitativamente a *sensibilidade* e a *especificidade* dum teste de rastreio ou de diagnóstico, temos que ter um *teste gold standard* como fonte de verdade e com o qual comparamos os resultados dos exames.

A validade dum teste define-se como a sua capacidade de distinguir entre quem tem doença e quem a não tem, e traduz-se por duas componentes:

- i. *Sensibilidade*, a capacidade de identificar corretamente os indivíduos que têm doença, ou melhor, a proporção de pessoas afetadas pela doença que foram corretamente identificadas como *verdadeiros positivos* pelo teste;
- ii. *Especificidade*, a capacidade de identificar os indivíduos que não têm doença, ou melhor, a proporção de pessoas não afetadas pela doença que foram corretamente identificadas como *verdadeiros negativos* pelo mesmo teste.

A sensibilidade e a especificidade têm grande interesse em Saúde Pública, mas na prática clínica a questão define-se com as seguintes perguntas: se o resultado dum teste é positivo num determinado indivíduo, qual a probabilidade do mesmo ter a doença? A resposta é dada pelo *valor preditivo positivo* (PPV) do teste. Mas se o resultado for negativo, qual a probabilidade da pessoa não ter a doença? A resposta é dada pelo *valor preditivo negativo* (NPV). No contexto do presente estudo, o PPV representa a probabilidade dum indivíduo que obteve uma CV+, obter uma posterior CO+; pelo contrário, o NPV representa a probabilidade dum rastreado que obteve uma CV-, obter uma posterior CO-. A Tabela 4.1 esquematiza todos os resultados e as variáveis que se podem obter para qualificar um teste de rastreio.

Tabela 4.1 Tabela de duas entradas, com os quatro resultados possíveis e as variáveis que qualificam um teste de rastreio

		Doença	
		+	-
Teste	+	VP a	FP b
	-	FN c	VN d

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b+d}$$

$$\text{PPV} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{NPV} = \frac{d}{c+d}$$

$$\text{LH+} = \frac{\frac{a}{a+c}}{\frac{b}{b+d}}$$

$$\text{LH-} = \frac{\frac{c}{a+c}}{\frac{d}{b+d}}$$

Tabela 4.2 Tabela de duas entradas para avaliação da CV em pólipos ≥ 6 mm (IC a 95%)

		Pólipos ≥ 6 mm	
		+	-
CV	+	66 a	26 b
	-	3 c	401 d

$$PPV = \frac{VP}{VP+FP}$$

$$NPV = \frac{VN}{VN+FN}$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a+c} = \frac{66}{69} = 0.95$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b+d} = \frac{401}{427} = 0.93$$

$$LH+ = \frac{\frac{a}{a+c}}{\frac{b}{b+d}} = \frac{\text{sensibilidade}}{\text{proporção de FP entre os casos negativos}} = \frac{0.95}{\frac{26}{427}} = 15.71$$

$$LH- = \frac{\frac{c}{a+c}}{\frac{d}{b+d}} = \frac{\text{proporção de FN entre os casos positivos}}{\text{especificidade}} = \frac{3}{\frac{69}{0.93}} = 0.05$$

$$\text{Acuidade (accuracy)} = \frac{\text{Nr. casos concordantes}}{\text{Nr. casos da amostra}} = \frac{461}{496} = 0.93$$

Nota: Estes resultados são discutidos no capítulo 2

A Tabela 4.2 exemplifica o esquema da Tabela 4.1 utilizando valores do presente projeto de investigação e referentes aos resultados da CV em relação aos pólipos ≥ 6 mm.

Quando a sensibilidade sugere a existência duma lesão, se LH (Razão de verossimilhança – *Likelihood ratio*) é positiva, a probabilidade de que esta lesão exista é tanto maior quanto mais alto é o valor de LH+. LH+ indica quanto vale a sensibilidade, tendo em conta a proporção de falsos positivos. LH- qualifica a especificidade, tendo em conta a proporção de falsos negativos.

A *Precisão ou acuidade* é a razão entre o número de casos concordantes (CV+,CO+ e CV-+CO-) e o número total de casos da amostra.

Ao contrário da sensibilidade e da especificidade, que são características do teste que está a ser usado, o PPV é afetado por dois fatores:

- i. Quanto mais alta é a *prevalência* da doença na população submetida ao rastreio maior é o valor de PPV;
- ii. Quanto mais baixa é a prevalência da doença, a especificidade aumenta o valor de PPV.

Um programa de rastreio é mais eficiente se aplicado a uma população de alto risco (alta prevalência), mais motivada para participar e mais disponível para aderir às recomendações se os resultados forem positivos. Assim, os resultados de qualquer teste devem ser interpretados no contexto da prevalência da doença na população onde o indivíduo se encontra inserido. Por outras palavras, um teste com PPV alto tem um valor se aplicado numa população de alto risco, mas não tem o mesmo valor e significado se aplicado numa população de baixo risco, pelo que o PPV deverá ser modelado pelo valor de baixa prevalência desta segunda população. No contexto do presente estudo, em que se avaliou uma população de risco médio, o valor alto da especificidade (0,93), em consequência da maioria dos rastreados se encontrar na célula d (VN=401), valoriza o valor alto do PPV encontrado. Garantidamente, a especificidade tem um maior efeito no PPV do que a sensibilidade.

O ideal seria que todos os rastreados estivessem totalmente distribuídos pelos VP e VN, o que na prática não acontece. Alguns indivíduos que não têm a doença são erradamente designados pelo teste como positivos – falsos positivos, e alguns indivíduos que têm a doença são erradamente designados como negativos – falsos negativos. Qual a importância destes

resultados?:

- i. Todos os rastreados com resultados positivos são levados a fazer testes mais sofisticados e dispendiosos, aumentando a carga orçamental individual e/ou dos sistemas de saúde, nacional ou privados;
- ii. Desencadeiam-se estados de depressão e ansiedade pela preocupação subjacente;
- iii. Criam-se estigmas individuais e sociais graves, mesmo na verificada ausência de doença;
- iv. A gravidade que pode advir dum indivíduo com doença ser informado da negatividade do teste, perdendo-se muitas vezes a oportunidade de cura.

Quando as variáveis a avaliar por um teste de rastreio são contínuas (p.ex tensão arterial, glicémia), há necessidade de se estabelecer um ponto de corte acima do qual o teste é considerado positivo, e abaixo do qual o resultado é considerado negativo. Coloca-se o problema dos falsos positivos ou dos falsos negativos aumentarem ou diminuírem, respetivamente, conforme o nível de corte é colocado mais alto ou mais baixo. Criamos dois grupos, um dos positivos e outro dos negativos, mas não temos qualquer informação da verdadeira situação da doença, razão do rastreio. O grupo de indivíduos com resultados positivos irá ser reencaminhado para futuros exames e aos indivíduos do grupo com resultados negativos não serão efetuados mais exames. A escolha do ponto de corte está relacionada com a importância relativa da falsa positividade e da falsa negatividade, com potenciais e importantes implicações financeiras e/ou emocionais, já atrás explicitadas.

Na prática, por vezes utiliza-se mais do que um teste, de forma sequencial ou simultânea. Num rastreio sequencial, ou em duas fases, geralmente executa-se inicialmente o teste menos dispendioso e mais confortável, cujos casos positivos são encaminhados para testes posteriores mais dispendiosos, mais invasivos e mais desconfortáveis, mas com maior sensibilidade e maior especificidade. Nos testes sequenciais há uma perda global no valor da sensibilidade e um aumento global da especificidade. Por outro lado, nos testes simultâneos há um aumento global da sensibilidade e um decréscimo global da especificidade, quando comparadas com os valores de cada teste individual. A escolha da estratégia a seguir, utilização em simultâneo ou em sequência dos testes, depende de vários fatores relacionados com o contexto de aplicação dos mesmos, o seu custo em termos de saúde pública e de agressividade individual, entre outros.

Se os resultados dum teste não se podem reproduzir, o seu valor e utilidade são mínimos, independentemente da sensibilidade e da especificidade do mesmo. Interferem com a fiabilidade ou reprodutibilidade vários fatores, nomeadamente:

i. *Variação intraindividual*

Os valores que se obtém quando se medem muitas das características humanas variam muitas vezes ao longo do tempo, mesmo durante curtos períodos. Ao avaliarmos qualquer resultado dum teste é importante considerar as condições em que o mesmo foi efetuado, incluindo a hora do dia;

ii. *Variação intraobservador*

Muitos testes são observador-dependentes e quanto maior é o grau em que os fatores subjetivos intervêm nos resultados, mais provável se torna que a variação intraobservador seja maior;

iii. *Variação interobservadores*

Dois examinadores podem variar na avaliação das mesmas alterações. Da necessidade de quantificação desta discrepância evoluiu o conceito de Concordância Percentual Global e a estatística Kappa:

1. *Concordância Percentual Global*

A razão entre o número de leituras concordantes e o número total de leituras, multiplicada por 100, dá-nos o valor da concordância percentual:

$$\text{Concordância Percentual} = \frac{\text{Nr. leituras concordantes}}{\text{Nr. total de leituras}}$$

Dum modo geral, a maior parte das pessoas que são submetidas a testes têm resultados negativos. É provável que haja uma considerável concordância entre dois observadores quanto aos resultados negativos (casos saudáveis/sem doença), o que pode constituir um viés na comparação das leituras, aumentando o valor da concordância percentual, e minimizando eventual discordância na avaliação dos casos positivos. Assim, uma forma de evitar este viés

é excluir dos cálculos os verdadeiros negativos, quer no numerador, quer no denominador da equação acima esquematizada;

2. Estatística Kappa

Uma forma de melhor precisar a concordância interobservadores é utilizar a estatística Kappa, proposta por Cohen⁵ em 1960, que vem dar resposta à seguinte pergunta: até que ponto é que a concordância entre dois observadores excede o nível de concordância que resulta apenas do acaso?

$$Kappa = \frac{(\text{Concordância Percentual observada}) - (\text{Concordância Percentual esperada apenas por acaso})}{100\% - (\text{Concordância Percentual esperada apenas po acaso})}$$

(Em que 100% representa o máximo de concordância possível)

Landis e Koch⁶, em 1977, definiram os valores significativos de Kappa:

- $K \geq 0.75$ -> Concordância excelente para além do acaso
- $0.40 \leq K < 0.75$ -> Concordância intermédia a boa
- $K < 0.40$ -> Concordância fraca

Para um melhor entendimento da estatística Kappa sugere-se a leitura dos trabalhos de MacLure e Willett⁷ e também de Fleiss⁸.

4.4 Conclusões

1. A decisão de rastrear uma população em relação a uma doença tem de ter em conta a prevalência e a gravidade da mesma, o seu comportamento biomolecular, a praticabilidade de detetá-la precocemente, a possibilidade de intervir eficazmente nos casos positivos e o cálculo global do custo-benefício em todos os seus aspetos, financeiros e emocionais;
2. Um ensaio aleatorizado controlado é o melhor desenho de estudo, mas na maioria dos casos é difícil de implementar por razões já descritas anteriormente;
3. Os estudos que comparam grupos rastreados com grupos não rastreados têm vieses que têm que ser controlados;
4. A avaliação da sensibilidade e da especificidade tem que ter em conta a falsa positividade e a falsa negatividade;
5. A ausência de benefício dum rastreio pode não ser apenas devida a uma história natural inapropriada da doença, mas também a uma terapêutica disponível inadequada no momento do diagnóstico precoce;
6. O balanço do custo-efetividade pressupõe custos financeiros e psicossociais. Um teste por ser barato não deve ser implementado se tiver grande falsa positividade e conduzir a testes dispendiosos, incómodos e com algumas complicações, além de poderem permitir perda do tempo oportuno de tratamento nos casos de falsa negatividade. Terapêuticas altamente invasivas, mas desnecessárias, aplicadas na sequência de testes de rastreio positivos mal avaliados, têm também que ser consideradas.

**Aplicabilidade da análise molecular do DNA Fecal
para rastreio da patologia colorretal esporádica**

5.1 REVISÃO DA LITERATURA

5.1.1 A genética do cancro

Desde cedo, os estudos a nível celular e molecular mostraram que os agentes de iniciação e progressão da neoplasia assentam em alterações no genoma^{1,2, 160}, mais frequentemente o silenciamento de genes supressores de tumores (ou oncosuppressores) e a ativação de proto-oncogenes. As proteínas codificadas pelos oncosuppressores assumem um papel crucial nos *checkpoints* do ciclo celular, inibindo a proliferação celular e o desenvolvimento de tumores. Os oncosuppressores são assim divididos em *gatekeepers* (genes que regulam diretamente a progressão do ciclo celular, ex. *TP53*, *APC*, *RBI*) e *caretakers* (genes que reparam danos no DNA, evitando a instabilidade genética, ex. *BRAC1*, *BRAC2* e *MMR*, genes de *mismatch repair*)^{3,4}. Se a lesão não for reparada, os oncosuppressores promovem a morte celular programada^{5,6}. O seu processo de inativação segue o modelo “2-hit”, que implica mutação bialélica para que o efeito se manifeste. A inativação de oncosuppressores é assim tida como recessiva surgindo frequentemente em consequência de deleções ou perda de heterozigotia (LOH, “*loss-of-heterozygosity*”), que levam à perda do gene e seus produtos, ou ainda graças a fenómenos epigenéticos como sejam a hipermetilação de DNA, transmitida de forma estável por mitose. Há no entanto exceções a este modelo recessivo, em que o alelo *wildtype* não é capaz de compensar o efeito do alelo mutado por haploinsuficiência (ex. *CDKN1B*)⁷ ou por efeito dominante negativo (ex. *TP53* no carcinoma colorretal⁸).

Os oncogenes são formas irregularmente expressas ou mutadas de proto-oncogenes com contribuição para o comportamento cancerígeno das células, ao favorecer a proliferação celular ou promover a falha da morte celular por apoptose. No primeiro caso, as proteínas atuam em vias estimuladas por fatores de crescimento e regulam componentes do ciclo celular que promovem a progressão para além de G1, quer sejam os próprios fatores de crescimento (estimulação autócrina), os seus recetores (ex. PDGFR e HER2), sinalizadores intracelulares (ex. Ras e Raf), fatores de transcrição (ex. Fos e Jun, componentes de AP-1) ou reguladores do ciclo celular (ex. ciclina D1)⁹. Exemplos da segunda situação são as alterações nos genes *PI 3*-cinase e *Akt* e a sobre-expressão de *Bcl-2*, por translocação, que bloqueia a apoptose em linfomas⁹. A ativação de oncogenes requer apenas mutação de um dos alelos do proto-oncogene, normalmente mutações pontuais que resultam na substituição de aminoácidos em posições críticas, daí que se caracterize por um efeito oncogénico dominante. Por outro lado, alguns cancros apresentam alterações de outra natureza, nomeadamente de estrutura cromossómica, como sejam translocações, duplicações ou deleções. Tais rearranjos originam

oncogenes como *c-myc* no linfoma de *Burkitt* ou o gene de fusão *Bcr/Abl* na leucemia mieloide crónica^{10,11}. Entre os mecanismos de ativação de oncogenes está também a amplificação génica, que resulta num aumento de expressão de determinadas proteínas como *N-myc* no neuroblastoma infantil e *HER2* no cancro da mama e do ovário⁹.

Por ser mais comum em fases mais tardias da vida, o desenvolvimento do cancro é tido como um processo de múltiplas etapas. A iniciação do tumor surge com a proliferação anormal de uma célula mutada, que se divide clonalmente e transmite à progenia as mesmas alterações genéticas, dando origem a um pólipó adenomatoso. A progressão do tumor resulta da promoção de mutações somáticas e a seleção de células com vantagens proliferativas e maior capacidade de sobrevivência, invasão e metástase, logo, maior malignidade. Este processo é designado por seleção clonal e dá origem ao carcinoma. Vários modelos foram desenvolvidos para representar a iniciação e progressão do cancro¹²⁻¹⁴, no entanto duas etapas centrais permanecem como base ao modelo proposto por Knudson¹⁵, e bem conhecido pelo modelo já referido ‘2-*hit*’^{14,16-18}: transformação inicial para um estágio pré-neoplásico, de crescimento exponencial, em que uma das células adquire uma segunda transformação que leva ao desenvolvimento neoplásico. A partir deste modelo foram desenvolvidos modelos mais gerais, com maior concordância com os dados biológicos^{14,16-19}.

5.1.2 Marcadores genéticos em DNA fecal para rastreio do CCR

A nível molecular assistiu-se a um largo progresso nas últimas décadas, no sentido de identificar e caracterizar as alterações genéticas envolvidas na transformação neoplásica²⁰⁻²³. O modelo inicialmente proposto por Fearon e Vogelstein 1990²⁴, e suportado por muitos outros estudos das áreas epidemiológicas e clínicas^{25,26}, aponta que a evolução da morfologia do tecido, desde mucosa saudável até ao carcinoma *in situ*, é acompanhada pela acumulação progressiva de mutações em *APC*, *K-RAS* e *TP53*.

O aumento progressivo do conhecimento relevou inicialmente para primeiro plano a deteção de sangue oculto nas fezes, a qual, conceptualmente, tem vindo a ser ultrapassada pela análise de marcadores moleculares em DNA fecal para rastreio de alterações pré-neoplásicas e neoplásicas. A análise de DNA fecal foi assim gradualmente ganhando terreno como método de diagnóstico e rastreio²⁷⁻³¹. A metodologia desenvolvida deteta alterações genéticas nas

células epiteliais esfoliadas do lúmen intestinal e excretadas diariamente em número que, num adulto saudável, se estima ser da ordem das 10^{10} células³². Aspeto ainda mais interessante é o da quantidade de DNA humano nas fezes de pacientes com cancro colorrectal parecer estar aumentada comparativamente à de indivíduos saudáveis (na ordem das 4-5 vezes), por um possível aumento de esfoliação inerente à desagregação física do tumor para o lúmen cólico^{27,33}. Contudo, apenas um número restrito de genes supera os limites aceitáveis de sensibilidade e especificidade requeridos para rastreio de diagnóstico sendo as classes mais promissoras de marcadores moleculares os oncogenes e genes oncosuppressores com responsabilidades diretas no crescimento celular neoplásico, tal como a seguir se descreve.

5.1.2.1 Mutações somáticas em *APC*, *B-RAF*, *K-RAS* e *TP53*

A proteína APC, com 321 kDa, participa na adesão celular e migração, na transdução de sinal, na organização dos microtúbulos e segregação cromossómica³⁴⁻³⁶ bem como na regulação do ciclo celular e da apoptose³⁵. O desempenho das suas funções está intimamente relacionado com a sua estrutura, da qual fazem parte: i) um domínio de oligomerização na porção N-terminal (resíduos 128-208)⁴¹; ii) região armadillo (resíduos 309-767)⁴²; iii) região central repetitiva, com 3 domínios de ligação (resíduos 1020-1186) seguidos de 7 domínios de regulação da β -catenina (resíduos 1256-2031)⁴¹⁻⁴³, intercalados por 3 regiões SAMP, (“*Ser-Ala-Met-Pro*”, de ligação à axina e condutina; resíduos 1569, 1719 e 2034); iv) domínio básico de ligação a microtúbulos e proteínas associadas na extremidade C-terminal (resíduos 2223-2579)⁴¹⁻⁴⁵. *APC* assume-se como um supressor tumoral, já que integra o complexo de degradação da β -catenina e regula assim os níveis intracelulares desta proteína na via sinalizadora Wnt^{36,37}. Nesta via, e em condições normais, a proteína β -catenina ativa a expressão de fatores de transcrição das famílias TCF (*T-cell factor*) e Lef-1 (*lymphoid enhancer factor-1*), por sua vez reguladores de genes que incitam a progressão do ciclo celular³⁸⁻⁴⁵.

O gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*, HGNC:583) localiza-se em 5q21-q22 e é constituído por 21 exões, dos quais apenas 16 são expressos^{42,43}. Pelas suas funções, APC é um alvo preferencial para mutações oncogénicas associadas a ambas a tumorigénese familiar e esporádica. Mutações somáticas em *APC* são apontadas como o evento iniciador da maioria das neoplasias colorretais, já que surgem com a mesma frequência em pequenos adenomas

com escassas alterações displásicas e em adenomas avançados e carcinomas colorretais^{36,46}. A análise mutacional indica que 60% das mutações em *APC* são mutações truncantes^{36,46,48} que ocorrem na região denominada *Mutation Cluster Region (MCR c.1286-1513)*^{41,43,47}, e que como tal interrompem os primeiros 3 domínios de regulação da β -catenina (resíduos 1256-1510). Há assim inativação de *APC* como oncosupressor uma vez que por aumento da β -catenina livre, a via de sinalização *Wnt* fica constitutivamente ativa, na ausência de fator Wnt. No entanto, os domínios de ligação são frequentemente mantidos, pelo que tanto *APC* normal como truncado mantêm a capacidade e afinidade de ligação à β -catenina^{42,43}. Por outro lado, se mantidos um mínimo de 3 domínios de regulação⁴¹ e a primeira região *SAMP* (resíduo 1569), constata-se uma eficiente formação e função do complexo de degradação da β -catenina^{39,43,48,49}. De acordo com o estudo de Traverso et al (2002)²⁷, a análise de DNA fecal permite a detecção de 57% das mutações em *APC* encontradas em tecido tumoral.

K-RAS pertence a um pequeno grupo de GTPases com expressão ubíqua no organismo e ostenta o importante papel de regulador-chave e transdutor intracelular das vias *RAS-RAF-mitogen-activated protein-kinase kinase (MEK) - extracelular signal-regulated kinase/MAP kinase (ERK/MAPK)* e *PI3K-AKT*^{50,51}. *K-RAS* alterna entre a forma inativa ligada a *GDP* e a forma ativa ligada a *GTP*, por ação de tirosinas cinases, em resposta ao sinal do recetor de membrana *EGFR (epidermal growth factor receptor)*. Uma vez ativada, liga-se e exerce a sua ação de GTPase sobre as moléculas efetoras subsequentes nas cascatas de sinalização em que participa e que induzem à proliferação e diferenciação celular, à invasão, à angiogénese e à apoptose^{32,52-55}. A isoforma K-RAS4B é a mais comumente expressa e apresenta os seguintes domínios: i) domínio G, conhecido como o domínio catalítico, que engloba o domínio N-terminal (resíduos 1-85) e que contém as regiões *GTP-binding pocket* (resíduos 10-16, 56-61 e 116-119); ii) *core effector region* (resíduos 32-40); e iii) domínio C-terminal (resíduos 165-189), que determina as modificações pós-traducionais e ancoragem à membrana plasmática, assim como inclui uma região hipervariável (resíduos 166-185)^{56-58,113}.

O gene *K-RAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, HGNC:6407)* localiza-se em 12p11.1-12.1 e apresenta 6 exões distribuídos por 45kb⁵⁷. Na presença de mutações específicas que dificultem a hidrólise de GTP pela *GTPase-activating protein*, *K-RAS* é constitutivamente mantida na conformação ligada a GTP¹²¹ e atua assim como oncogene. Foi demonstrado ainda que as mutações em *K-RAS* podem contribuir para a angiogénese tumoral, já que aumentam a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)^{59,60}. Para além das formas hereditárias em leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica juvenil, síndrome de Noonan tipo 3⁶¹⁻⁶³ e síndrome cardio-facio-cutâneo⁶⁴, são também frequentes as formas oncogénicas somáticas presentes em cânceros do

pâncreas, do pulmão, colorretal, gástrico e astrocitoma policítico⁶⁵⁻⁶⁸ e, embora mais raramente, também em neoplasias do fígado, do endométrio, da mama e cervicais^{62,69,70}. Cerca de 96% das mutações pontuais descritas em CCR são *missense* e afetam os c. 12, 13 e 61^{71-73,76,78}, sendo que 80-90% destas são mutações somáticas no c. 12^{74-77,79,80}. A evidência mais recente aponta para um papel determinante de *K-RAS* na progressão do CCR mas não na sua iniciação visto as alterações serem mais frequentes em CCR (40-50%)^{52,73-77} ou pólipos \geq a 10mm (15-40%) do que adenomas^{71,74,77,81,82}. Alguns autores reportam que a sensibilidade deste marcador em detetar lesões em amostras fecais fica-se pelos 40%, embora a especificidade para pólipos adenomatosos e hiperplásicos seja de 60-70%^{73,79}. Além disso, as alterações genéticas associadas ao gene *K-RAS* observam-se também em células hiperproliferativas não neoplásicas, o que pode limitar seriamente a sua especificidade⁸³.

Uma vez que a presença de mutações somáticas em *K-RAS* ativa as vias RAS-RAF- MEK-ERK/MAPK e PI3K-AKT independentemente da ação do ligando EGF, é biologicamente plausível que estes pacientes demonstrem resistência à terapia com inibidores das tirosinas cinases de EGFR^{84,85}. A determinação do estado mutacional de K-RAS é assim um dos mais importantes indicadores da resposta ao tratamento biológico, anticorpos monoclonais dirigidos aos EGFR em CCR metastático^{80,86-89}, e atualmente usados como terapia de segunda linha em pacientes cujos tumores não respondem à quimioterapia. A sua identificação ajuda assim a selecionar a terapia, otimizando-se recursos e evitando-se toxicidade desnecessária.

B-RAF é também uma interveniente na via de sinalização *RAS-RAF- MEK-ERK/MAPK*^{50,51}, subsequente a *K-RAS*. A proteína B-RAF, expressa em todos os tecidos do organismo, pertence à família RAF/Mil de serina-treonina cinases e é composta pelos seguinte domínios funcionais e estruturais: i) *RAS-binding domain BD* (resíduos 155-227); ii) *Phorbol-ester/DAG-type Zinc binding domain* (resíduos 235-280); iii) serina-treonina cinase (resíduos 457-714) e iv) *ATP binding domain* (resíduos 463-471).

O gene *B-RAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*, HGNC:1097) localiza-se em 7q34 com 190kb e é composto por 18 exões. Mutações neste gene frequentemente alteram o seu domínio regulatório em N-terminal, dando origem a uma oncoproteína com atividade desregulada associada a diversos cancros⁹⁰⁻⁹², como sejam CCR^{93,94}, do pulmão⁹⁵, melanoma⁹⁶ e linfoma não-Hodgkin. As alterações somáticas em *B-RAF* ocorrem em 10-18% dos CCR, embora presente em cerca de 30% das lesões colorretais não malignas e pólipos de pequenas dimensões. Especula-se assim que tais eventos genéticos são precoces na lesão colorretal⁷¹ e que uma fração destas não progride para CCR, sugerindo a sua cooperação com outros fatores genéticos e epigenéticos para a transformação maligna^{71,97}. As mutações

potencialmente oncogénicas localizam-se, na sua quase totalidade, no *hotspot* mutacional c.600 GTG>GAG (Val>Glu) e surgem associadas a pólipos hiperplásticos e serrados, instabilidade de microssatélites e fenótipo metilado nos ilhéus CpG (CIMP)^{71,98,99}. De acordo com o estudo de Jin et al (2006)⁷³, a análise de DNA fecal permite a deteção de 75% das alterações *B-RAF* encontradas em tecido tumoral. A identificação de mutações em *B-RAF* é também importante para determinar a resistência à terapia anti-EGFR, assim como apresentam um pior prognóstico e sobrevivência quando tratados com estes antagonistas^{100,101}. Os estudos mais recentes demonstram que, para além destes, deve ser considerado o estado mutacional de *PIK3CA* e *PTEN*^{78,100,102}.

A proteína p53, a ‘guardiã do genoma’ como lhe chamou Levine (103) pelo seu envolvimento no controlo da proliferação celular e pelas suas funções oncosupressoras em resposta a dano de DNA, stress oxidativo, choque osmótico e ativação de oncogenes¹⁰³. É uma fosfoproteína com localização nuclear, com 393 resíduos e vários domínios estruturais e funcionais: i) domínio N-terminal (resíduos 1-42); ii) região rica em prolinas (resíduos 64-92); iii) *DNA-binding core domain* (DBD, resíduos 102-292); iv) domínio de oligomerização (resíduos 307-355); v) sinal de importação nuclear (resíduos 316-325) e vi) região C-terminal (resíduos 356-393)¹⁰⁴. Em condições celulares normais, a proteína p53 encontra-se ligada a MDM2, uma ubiquitina ligase que inibe a sua atividade, promove a exportação para o citoplasma e a sua ubiquitinação para degradação proteolítica¹⁰⁵. Em situações de stress celular, o domínio N-terminal de p53 é fosforilado pelas cinases MAPK, ATK, ATM ou CHK1/2, ou ativado por p14ARF estimulado por oncogenes, e o complexo p53-MDM2 dissocia-se¹⁰⁶. Assiste-se a uma alteração da conformação de p53, com aumento do seu tempo médio de vida e acumulação no núcleo¹⁰⁷. A proteína interage assim com o DNA, assumindo-se como um regulador da transcrição de genes-alvo que promovem i) a paragem do ciclo celular em G1 (*p21*, um inibidor de Cdk2); ii) a reparação de DNA (ex. *p48*) e iii) a apoptose (*PUMA*, *Bax* e *Noxa*, da família Bcl-2),

O gene *TP53* (*tumor protein p53*, HGNC:11998) localiza-se em 17p13.1 e contém 20kb, com 11 exões¹⁰⁸. São conhecidas mutações germinativas neste gene no Síndrome de Li-Fraumeni (OMIM:151623)¹⁰⁹, no entanto, é em cancros esporádicos que *TP53* surge mais frequentemente mutado, estando descritas alterações somáticas em 40-50% dos CCR¹¹⁰⁻¹¹³. As formas mutadas são incapazes de desempenhar corretamente a sua ação oncosupressora, instalando-se assim um ambiente permissivo a alterações genéticas e cromossómicas que é selecionado positivamente pelas células cancerígenas. Em CCR, mais de 95% das mutações detetadas em *TP53* ocorrem na porção c.126-331¹¹⁰, a qual integra o domínio DBD que interage fisicamente com o DNA e medeia assim a resposta ativadora de p53^{114,115}. Cerca de

80% das mutações descritas são não sinónimas responsáveis por uma proteína estável, com o número normal de resíduos¹¹⁶. Quando alteradas exercem uma ação dominante negativa sobre o alelo normal, silenciando-o, o que faz com que os níveis de *p53* funcional sejam bastante inferiores a 50%¹¹⁷. Embora as mutações somáticas possam ser observadas em vários estádios, estas são mais comuns nos mais avançados (10-40% dos adenomas do cólon e reto e pólipos serrados, 50-80% dos CCR)^{81,112,118-120}. É sugerido mesmo que a inativação de TP53 ocorre com a transição de adenomas para displasia de alto grau⁸. A análise de *TP53* em tecido tumoral e fezes tem uma sensibilidade de 60% para deteção de CCR⁷⁹, um achado ilustrando bem quanto importante é o seu índice de evidência útil no rastreio não invasivo.

5.1.2.2 Marcador de integridade do DNA (Long DNA)

De entre as células do lúmen intestinal esfoliadas diariamente, uma certa proporção mantém a sua integridade genómica por *bypass* ao mecanismo apoptótico ou por resistência das células tumorais a várias enzimas de degradação²⁹. A disfunção do mecanismo apoptótico graças a alterações genéticas ou epigenéticas de um dos seus intervenientes poderá poupar o material genómico da típica fragmentação em pequenos segmentos de 180 a 210 pb^{121,122}. Através da utilização de testes moleculares, é possível avaliar a integridade do DNA com a pesquisa de DNA de elevado peso molecular (mais de 1 kb; designado por Long DNA ou L-DNA). O estudo de Abbaszadegan e colegas relata uma diferença estatisticamente significativa entre as proporções de L-DNA em DNA fecal de indivíduos com CCR (64%) e DNA fecal de indivíduos com tecido cólico normal (5%; $p < 0.001$)²⁹. Segundo este mesmo trabalho, a especificidade L-DNA como marcador tumoral em amostras fecais atinge os 95%, o que o destaca como um potencial marcador para rastreio não invasivo. Um estudo anterior detetou L-DNA em 55% de adenomas e 70% dos casos de cancro colorretal¹²³. Publicações mais recentes, com ensaios de PCR em Tempo Real, apontam para uma associação mais robusta e fiável dos níveis de L-DNA, significativamente mais elevados em amostras fecais com patologia colorretal^{124,125}.

5.1.2.3 Painéis multimarcadores

Os painéis multi-marcadores em DNA de lesões biopsadas revelaram-se de grande utilidade, sobretudo na identificação de 45-92% dos casos de CCR com mutações identificadas em pelo

menos um marcador^{73,79}. A inclusão destes marcadores em painéis de análise fecal desde cedo mostrou-se bastante promissora, com sensibilidade para 52-91% dos CCR (especificidade de 92- 95%)^{28,43,73,79,123,126,127}. A sua deteção é mais frequente em casos do cólon distal, provavelmente devido ao menor tempo de degradação desde a exfoliação à captação. Embora inferior, a sensibilidade de deteção de lesões avançadas varia entre os 32-82% (especificidade 93-95%)^{28,43,123,126,127}, a qual importa melhorar como ferramenta de rastreio não invasivo. Os intervalos de sensibilidade podem ser explicados por painéis de marcadores distintos e em número variável (entre 15 a 23 marcadores), assim como na metodologia do estudo e diferenças no espetro clínico da doença (tamanho, estágio e localização das lesões).

5.2 OBJETIVOS

Para além dos objetivos definidos na secção 1.2, era nossa proposta inicial vários objetivos específicos 1.1 - pesquisar mutações somáticas em regiões génicas de *APC*, *B-RAF*, *K-RAS* e *TP53* em 30 lesões colorretais com dimensão ≥ 6 mm e diferentes localizações cólicas e classificações histológicas, assim como interpretar o seu significado biológico com recurso à literatura e bases de dados da especialidade; 1.2 – avaliar a sensibilidade da análise destes marcadores genéticos no DNA fecal, dos mesmos participantes, em identificar lesões pré-malignas e malignas; 2 – analisar a associação da integridade de DNA (L-DNA) em DNA fecal a vários estádios da patologia colorretal, com base numa amostra caso-controlo, respetivamente composta por amostras fecais de indivíduos com e sem lesões cólicas na colonoscopia ótica (casos n=95, controlos n=97), assim como a sua sensibilidade e especificidade.

*NOTA: Todavia, fatores limitativos da maior relevância, em que assume papel preponderante as limitações financeiras com que nos confrontámos, impediram que tivéssemos podido cumprir este estudo em todos os rastreados. Neste âmbito, destacamos os objetivos que não foram cumpridos: i) o estudo de associação caso-controlo de um painel de alterações genéticas em *APC*, *BRAF*, *KRAS*, *TP53*, *mt DNA D310*, *BAT26*, *L-DNA* e epigenéticas em *MLH1*, *ADAMTS1*, *HOXA9*, *MAL*, *MGMT*, *p16* e *Vimentina*, em DNA de sangue e tecido cólico de 100 indivíduos com lesões cólicas em vários estádios de progressão da patologia colorretal e 100 indivíduos sem lesões cólicas, rastreados por CO. Para os loci que se verificassem associados à patologia colorretal pretendia-se prosseguir com a sua análise em DNA fecal. O estudo genético ficou comprometido por limitações técnicas evidenciadas nas secções seguintes. A análise epigenética não foi realizada, pela impossibilidade de se conservar as amostras de tecido biopsado e amostras fecais em azoto líquido nos 30 minutos subsequentes à sua recolha e pelo orçamento apresentado para aquisição do ensaio comercial; ii) genotipagem de *BAT26* não se revelou bem sucedida, mesmo após rigorosas e criteriosas tentativas para otimização da PCR^{29,143}; iii) genotipagem de *mtDNA D310*, de acordo com as condições descritas¹²⁸⁻¹³⁵, ficou igualmente comprometida, por tratar-se de uma repetição mononucleotídica (C)_n, que não é detetável por corrida de fragmentos em sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems). No sentido de ultrapassar dificuldades de cariz técnico tentou-se estabelecer uma colaboração com a empresa norte-americana Exact Sciences que, em Novembro de 2010, lançou o primeiro kit comercial de pesquisa de DNA fecal, atualmente em aprovação pel FDA. A equipa, no nome do Dr. Barry Berger demonstrou grande interesse na colaboração e reconheceu a importância e qualidade do desenho do presente estudo. A colaboração foi, no entanto, comprometida uma vez que o procedimento estabelecido por esta equipa implicava um volume mínimo de 10g de amostra fecal e a utilização de um tampão de estabilização aquando da recolha.*

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Amostragem e constituição do biobanco de DNA

Para a análise molecular foram recolhidas amostras de sangue, biópsia de tecido cólico e fezes de todos os participantes. A amostra de sangue foi colhida por venipunctura em tubos EDTA 5 ml, por profissionais devidamente creditados. O tecido cólico foi biopsado aquando da CO e conservado a -20°C por um período inferior a 2 horas pós-biópsia, após o qual foi conservado a -80°C até ao procedimento de extração. A amostra fecal foi colhida previamente à preparação para a colonoscopia. Foram recolhidos ~3g de amostra fecal (o equivalente à dimensão de uma noz), em recipiente de plástico esterilizado, e conservado imediatamente entre -10°C a -20°C num período máximo de 24h. A cada amostra foi atribuído um código, para sua fácil identificação e de forma a garantir o anonimato durante a análise laboratorial. As amostras biológicas foram transferidas para as instalações do Laboratório de Genética Humana (LGH) da UMa, em contentor refrigerado, e mantidas a -80°C. O isolamento de DNA no material biológico recolhido foi efetuado por métodos standardizados, nomeadamente *salting-out* para a fração leucocitária de sangue periférico (procedimento otimizado pelo LGH) e pela utilização de *kits* comerciais para as amostras de tecido cólico biopsado (*DNeasy Blood & Tissue*, Qiagen) e fezes (*Stool DNA Mini kit*, Qiagen), seguindo-se as instruções dos fabricantes. A amostra de sangue determina a informação genética germinal, não neoplásica, e representa assim uma referência para que se compare com a sequência de DNA dos loci de interesse no tecido e DNA fecal. O restante volume de amostras de tecido, sangue e fezes foi conservado a -80°C, e constituiu um *backup* de material genético. A conservação do material genético a -20°C, assim como os respetivos dados em base de dados construída para o efeito, seguem normas e procedimentos restritos que priorizam e garantem a segurança, a integridade, a gestão e o controlo de qualidade das amostras, bem como o cumprimento das considerações éticas. A qualidade e concentração de DNA obtidos pelos métodos inframencionados foram acedidos por espectrofotometria (rácios Abs 260/230nm e 260/280nm) e visualmente, por eletroforese em gel agarose a 0.5% com brometo de etídio (80V, 45 mins), com marcador de tamanho Lambda DNA/Eco91I (BstEII) (Fermentas).

5.3.2 Pesquisa de mutações somáticas em regiões dos genes *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53*

5.3.2.1 Amplificação de DNA por Polimerase Chain Reaction (PCR)

A pesquisa de mutações somáticas foi realizada em amostras de DNA extraído de sangue e de tecido, de um subgrupo de 24 indivíduos com 30 lesões colorretais, detetadas e biopsadas

endoscopicamente e histologicamente caracterizadas^{140,140a,140b,140c}. Quando detetadas mutações somáticas, estas foram pesquisadas no DNA fecal correspondente. Este subgrupo é composto por 4 adenocarcinomas bem diferenciados, 12 adenomas tubulares sésseis com displasia de alto grau, 1 adenoma viloso sésil com displasia de alto grau, 3 adenomas tubulares sésseis com displasia de baixo grau, 7 pólipos hiperplásicos sésseis serreados e 3 pólipos hiperplásicos sésseis^{140a,140b,141}. No que respeita à forma e dimensão, as lesões analisadas classificam-se como: pólipos $\geq 10\text{mm}$ (n=21), 6-9mm (n=8) e lesão plana/prega (n=1). Topograficamente estas lesões localizaram-se: reto – 10; cólon sigmoide – 8; cólon descendente – 2; cólon transversal – 5; cólon ascendente – 3; cego – 2. Todo o procedimento da genotipagem subsequente foi efetuado sem qualquer tipo de informação ou cruzamento clínico dos participantes. As regiões génicas a analisar foram priorizadas de acordo com a maior probabilidade de ocorrência de mutações somáticas, descrita em *COSMIC Database* (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*; Wellcome Trust, Sanger Institute, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>)^{112,113}, nomeadamente *APC* (c. 1202-1674), *K-RAS* (c. 12 e 13), *B-RAF* (c. 600) e *TP53* (exões 5-9, c. 1202-1674). Para a amplificação por PCR, utilizaram-se *primers* selecionados na literatura (ver Tabela 5.1), cuja especificidade para a amplificação de regiões genómicas humanas foi individualmente verificada pela utilização do *freeware BLAST Genomic Tools for Human, Eukaryotic and Microbial genomes* (NCBI Genomes, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>).

Cada mistura de reação de PCR continha 1x tampão PCR, 2.0-2.7mM MgCl₂, 200nM de cada *primer forward* e *reverse*, 200-270nM *dNTP mix*, 2-3U de *Taq DNA Polimerase* e 20-100ng/ml de DNA molde. Após optimização, revelaram-se de maior sucesso as condições sumarizadas na Tabela 5.1. Para a amplificação de DNAs extraídos de sangue e de tecido utilizou-se a *Firepol Taq DNA Polimerase* (Solys Biodyne, Estónia). Para a amplificação de DNA extraído de fezes utilizaram-se as enzimas *Firepol Taq DNA Polimerase* (Solys Biodyne, Estónia), *GreenTaq DNA Polimerase* (Fermentas) e *Hot Start Plus Taq Polimerase* (Qiagen) e respetivos tampões de reação. Adicionalmente, nas amplificações de DNA fecal, revelou-se necessária a utilização de 10mg BSA (*Bovine Serum Albumin*, Fermentas), e de dimetil-sulfóxido a 15% (DMSO, Sigma) em algumas amostras.

O sucesso da PCR, a sua especificidade e tamanho dos fragmentos foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1-2% (80 V, 45 mins), corado com brometo de etídio e com 0,4µg marcador de tamanho *O'Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder*, ready-to-use (Fermentas, Lituânia). A visualização e arquivo da imagem foram feitos em transiluminador UV *Universal Hood II* (Biorad) com o software *Quantity One 1D Analysis* (version 4.5.2, Biorad).

5.3.2.2 Sequenciação e análise de sequências

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos a purificação enzimática com Exonuclease I (ExoI, Fermentas): *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em sequenciador automático local ABI 310 (*Applied Biosystems*), com os primers forward usados para a amplificação (10pmol/μl) e com recurso à química *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*, Portugal), num total de 10μl e mínimo de 1μl de produto PCR a 50ng/μl. Os produtos da reação de sequenciação foram purificados em colunas *Mini Spin* (Qiagen) com *Sephadex™ G-50* (*GE Healthcare*) e desidratados a 94°C. Para a eletroforese capilar, adicionou-se 20μl formamida aos produtos da reação de sequenciação, seguidamente desnaturados a 94°C durante 3 mins e colocados a 0°C durante 3 mins, para que se obtivessem ssDNA (*single-stranded DNA*)

As sequências em formato *.abi, obtidas com o software *ABI PRISM 310™ Collection* (software *Sequencing Analysis version 3.4.1*) foram analisadas com o software *Sequencher 4.10.1 – Build 5828*, tendo como referência as sequências *NCBI Reference Sequences (RefSeq)*. Utilizaram-se os parâmetros *default* do software e definiram-se os seguintes critérios adicionais:

- i) *trim ends*;
- ii) mínima qualidade da sequência de 80%;
- iii) extensão do fragmento esperado mínima de 70%;
- iv) deteção picos secundários com área mínima de >20% (e inspeção visual pelo utilizador).

Quando detetadas mutações, repetiu-se a amplificação por PCR para essa mesma amostra e marcador molecular e repetiu-se a sequenciação com ambos os *primers forward e reverse*.

5.3.2.3 Ensaio PCR em Tempo-Real para K-RAS (c. 12 e 13) e B-RAF (c. 600)

A utilização de *K-RAS* e *B-RAF* por PCR *Real-Time* destina-se a comparar a sensibilidade da técnica para a pesquisa destes marcadores relativamente à sequenciação tal como antes referenciado. Para o efeito, utilizou-se o *kit* comercial *K-RAS/B-RAF* (*Entrogen*, EUA),

Tabela 5.1 Condições de PCR e primers utilizados na amplificação das regiões de interesse em APC, K-RAS, B-RAF e TP53

Marcador	Loci	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Tamanho fragmento (bp)	Referência	Programa amplificação (DNA de sangue e tecido biopsado)	Programa amplificação (DNA de fezes)
APC-1	Códex 1202-1366	GGACAAAGCAGTAATAAACCGAAGCAT	GAGCACCACTTTTGGAGGGAGATT	493	Jom et al 2008	94°C 1' (94°C 30s-52°C 30s-72°C 30s)x40-72°C 5'	94°C 1' (94°C 30s-56°C 20s-74°C 30s)x40-72°C 5'
APC-2	Códex 1315-1493	CTGAAGATCCCTGTGTAAGCGGAAGTT	TCCGTGGCAAAATGTAAATAAAGTA	536	Jom et al 2008	94°C 1' (94°C 30s-52°C 30s-72°C 30s)x40-72°C 5'	94°C 1' (94°C 30s-52°C 30s-72°C 30s)x40-72°C 5'
APC-3	Códex 1448-1674	ACCAAGCGAGAGGTACCTTAAAAAT	CTCCTTCCTCCACGAGCTAACCTAT	682	Jom et al 2008	94°C 1' (94°C 30s-50°C 40s-72°C 40s)x40-72°C 5'	94°C 1' (94°C 30s-60°C 1' 74°C 1s)x40-72°C 5'
BRF	Exão 15	TCATAATGCTTGGCTCTGATAGGA	GCCCCAAATTTAATCAGTGGGA	215	Xu et al 2003	94°C 1' (94°C 30s-48°C 30s-72°C 20s)x40-72°C 5'	94°C 1' (94°C 30s-48°C 30s-72°C 20s)x40-72°C 5'
KRAS	Exão 2	GTATTAACCTTAATGTGTGACATGTCTAAT	ACTCATGTGAAAATGGTTCAGAGAAACCTTTAT	266	Jom et al 2008	94°C 1' (94°C 30s-48°C 30s-72°C 20s)x40-72°C 5'	94°C 1' (94°C 30s-48°C 30s-72°C 20s)x40-72°C 5'
TP53-2	Exões 5-6	TGTTTCACTTGTGGCCTGACT	TTAACCCTCTCTCCACAGAGA	467	IARC	94°C 5' - (94°C 30' - 60°C 45' - 72°C 45')x40 - 72°C 10'	94°C 5' - (94°C 30' - 55°C 45' - 72°C 45')x40 - 72°C 10'
TP53-3	Exão 7	CTTGGCCACAGGCTCTCCCAA	AGGGGTTCAGAGCCAAAGCAGA	237	IARC	94°C 5' - (94°C 30' - 63°C 20' - 68°C 20')x40 - 68°C 5'	94°C 5' - (94°C 30' - 55°C 20' - 68°C 20')x40 - 68°C 5'
TP53-4	Exões 8-9	TTGGGAGTAGATGGAGCCT	AGTGTAGACTGGAAACTTT	445	IARC	94°C 5' - (94°C 30' - 61°C 45' - 72°C 45')x40 - 72°C 10'	94°C 5' - (94°C 30' - 56°C 45' - 72°C 45')x40 - 72°C 10'

seguindo-se as recomendações do fabricante. Este ensaio deteta 11 génes mutados em c. 12, 13 e 61 de *K-RAS* e c. 600 de *B-RAF*, pela hidrólise de sondas *TaqMan* marcadas na extremidade 5' com fluoróforos FAM (mutação) e VIC (*wildtype*). A amplificação das regiões e deteção do sinal foi feita no termociclador em Tempo-Real iQ5 (BioRad) com o *Optical System Software* (Biorad). Os valores do *threshold cycle* (Ct) foram usados para interpretar o sinal positivo num intervalo de ciclos entre 22 e 29. Em cada set de amostras analisadas é utilizado um controlo endógeno da amplificação

5.3.3 Análise de L-DNA em amostras fecais

O marcador L-DNA foi analisado num universo amostral de 192 amostras de DNA fecal, entre as quais 97 participantes sem alterações cólicas observáveis em colonoscopia ótica (controlos) e de 95 participantes com lesões cólicas (casos). A análise teve em conta a amplificação por PCR de um fragmento com cerca de 1500pb que compreende os exões 6-9 do gene *TP53* (*primers* e condições descritas em Beroud et al 1995 e Abbaszadegan et al 2007)^{29,142}. Utilizou-se como controlo de amplificação um fragmento do gene *APC* com aproximadamente 120pb (designado por *Short DNA* ou *S-DNA*). A reação de PCR foi efetuada com o *kit Qiagen Multiplex PCR* (Qiagen) em termociclador *BioRad iQ5 Thermocycler*, de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído de sangue e água ultrapura foram utilizados como controlo positivo para a presença de L-DNA e controlo de contaminação, respetivamente. O sucesso da amplificação e os resultados foram aferidos por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (80V, 45mins), e visualizado em transiluminador UV *Universal Hood II* (Biorad) com o software *Quantity One 1D Analysis* (version 4.5.2. Biorad).

5.3.4 Análise estatística

Para o universo amostral analisado com os marcadores *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53* (n=30), a positividade do painel molecular foi avaliada em cada categoria considerada, nomeadamente a caracterização histológica, a dimensão, a localização da lesão e o número de lesões, pela aplicação do teste χ^2 (com correção de *Yates*), para todas as classes e em cada classe individual comparada com as restantes agrupadas (OR determinado em tabelas 2x2). Os resultados do marcador L-DNA, obtidos para um total de 192 amostras em ambas as classes com e sem lesões colonoscópicas detetadas (casos e controlos, respetivamente), foram igualmente analisados em cada categoria com o teste χ^2 (com correção de *Yates* ou teste exato de *Fischer*) e por modelos de regressão logística, ajustada para fatores estratificantes. A razão das probabilidades (*Odds Ratio*, OR) e respetivo intervalo de confiança a 95% foram determinados para os testes χ^2 e modelos de regressão logística. A análise comparativa da variável categórica L-DNA com variáveis contínuas da amostra foi feita com o teste *t-Student*. Os resultados foram interpretados a um nível de significância de 5%. Toda a análise estatística foi realizada em software *SPSS for Windows (release 16.0)* e com o auxílio da ferramenta *OpenEpi version 2.3.1*¹⁹²

5.3.5 Consulta de Bases de Dados

Para a interpretação dos resultados dos marcadores analisados e interpretação do significado biológico das alterações encontradas, recorreu-se à consulta de bases de dados, nomeadamente *COSMIC Database (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, Wellcome Trust, Sanger Institute, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>)*^{112,113} e *IARC TP53 mutation database (International Agency for Research in Cancer, R15 update, November 2010, <http://www.iarc.fr/p53>)*¹¹⁰. A informação detalhada sobre polimorfismos foi acedida em *dbSNP, Short Genetic Variations (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)*¹⁹³. Para a informação relativa a proteínas, suas características e variações recorreu-se à *UniProt (<http://www.uniprot.org/>)*¹⁹⁴.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 - Pesquisa de mutações somáticas em regiões génicas de *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53*

Apesar das várias tentativas de otimização da PCR, inclusivamente com a utilização de *Taq DNA* Polimerases com diferentes características, a taxa de sucesso para os marcadores propostos ronda os 70% em DNA de sangue e tecido, não ultrapassando 20% em DNA fecal. Adicionalmente, apenas cerca de 60% das sequências em cada *set* apresentaram boa qualidade para a análise. Tendo em conta estas limitações, a determinação dos resultados que se seguem foi garantido por sucessivas tentativas de amplificação e sequenciação, que não é compatível com um procedimento de rotina ou análise de amostras em média/larga escala.

Os resultados da sequenciação dos marcadores analisados nestas amostras encontram-se sumarizados na Tabela 5.2. Com a análise mutacional de *APC* c. 1202-1674 detetaram-se sete mutações somáticas entre c. 1286-1398. Destas, cinco ocorrem em adenomas tubulares sésseis, quatro dos quais com displasia de alto grau, dimensão ≥ 10 mm e localizadas no reto e cólon sigmoide, enquanto que uma em lesão com displasia de baixo grau, dimensão ≥ 10 mm e localizada no cólon transverso. Destacam-se três mutações nonsense c. 1286 GAA>TAA (Glu>STOP, g. 3856), c. 1294 CAG>TAG (Gln>STOP, g. 3880), c. 1306 GAA>TAA (Glu>STOP, g. 3916) e duas *frameshift*, tais como c. 1398 AGT>delAG (Arg>Phe Fs*9, g. 4192-4193) e c. 1319 CCT>delC (Pro>Leu, Fs *2, g. 3956). Identificaram-se a mutação *nonsense* c. 1309 GAA>TAA (Glu>STOP, g. 3925) num pólipó sésil serreado com dimensão entre 6-9mm localizado no reto e a mutação *missense* c. 1317GAA>CAA (Glu>Gln, g. 3949) num pólipó hiperplástico sésil com dimensão < 6 mm localizado no cólon transverso. Encontrou-se uma alteração sinónima germinativa em c. 1493ACG>ACA (Thr>Thr, g. 4479) em cerca de 80% dos indivíduos analisados, 54% dos quais em heterozigotia.

Na análise de *K-RAS* c. 1-37 foram detetadas 4 mutações somáticas não sinónimas em três adenomas tubulares sésseis com displasia de alto grau e dimensão ≥ 10 mm, no reto, cólon sigmoide e cólon ascendente (c. 13 GGC> GAC (Gly>Asp)), c. 12 GGT>GAT(Gly>Asp) e c. 12GGT>TGT (Gly>Cys), respetivamente) e um adenoma tubular sésil com displasia de baixo grau, dimensão ≥ 10 mm, biopsado do cólon transverso(c. 12GGT>GTT(Gly>Val)).

De entre as amostras analisadas, observou-se que o exão 15 do gene *B-RAF* encontra-se mutado em c. 600 GTG>GAG (Val>Glu) em dois pólipos hiperplásticos sésseis serreados, um dos quais com 6-9mm no cólon sigmoide e outro com ≥ 10 mm na ampola cecal.

Tabela 5.2 Pesquisa de mutações somáticas em regiões dos genes *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53*.

Ref amostra	Marcador genético					Caracterização da lesão mais avançada (cm e c.)	Classificação histológica
	APC1	APC2	APC3	KRAS	BRAF		
DNA Tecidos							
263-380	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	C
38-832	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	I
215-357	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	D
377-559	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	A
516-75	c.1294 CAG/TAG	c.1398 AGT/delAG	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	c.273 CGT/CAT, 19 bp12 T/C	A
401-503	c.1286 GAA/TAA	RE	RE	RE	RE ^o	RE	B
615-840	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE ^o	RE	C
626-810	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	C
643-843	RE	RE	RE	c.13 GGC/GAC	RE	RE	C
646-851	c.1319 CCT/del C	RE	RE	RE	RE	RE	D
422-564	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	c.12 GGT/GAT	RE ^o	RE	D
626-811	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	D
615-841	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	G
516-76	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	c.12 GGT/TGT	RE	19 bp12 T/C	I
524-700	RE	RE	RE	RE	RE	RE	C
524-703	RE	RE	RE	RE	c.213 CGA/CGG	RE	E
314-460	RE	RE	RE	RE	c.213 CGA/CGG	c.273 CGT/CAT	A
84-181	RE	RE	c.1493 ACA	c.12 GGT/GTT	RE	RE	F
672-864	c.1306 GAA/TAA	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	F
82-135	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	G
544-748	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	G
299-448	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	G
633-827	c.1317 GAA/CAA	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	D
592-815	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	I
592-816	RE	RE	c.1493 ACA	c.600 GTG/GAG ^o	RE	RE	I
165-376	c.1309 GAA/TAA	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	18 bp10 C/A	J
640-836	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	K
474-639	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	A
682-920	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	D
640-837	RE	RE	c.1493 ACA	RE	15 bp14G/A	RE	D
DNA Sangues							
263	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	E
38S (74S)	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	
215	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
377	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	19 bp12 T/C	
516	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
401	RE	RE	RE	RE	RE	RE	
615	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
626	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
643	RE	RE	RE	RE	RE	RE	
646	RE	RE	RE	RE	RE	RE	
422	RE	RE	RE	RE	RE	RE	
524	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	c.213 CGA/CGG	RE	
314	RE	RE	RE	RE	RE	RE	
84	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	
672	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
82	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
544	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
299	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
633	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	
592	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	
165	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
640	RE	RE	c.1493 ACA	RE	RE	RE	
474	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	
682	RE	RE	c.1493 ACG/ACA	RE	RE	RE	

Na região priorizada para análise de *TP53* c. 126-331 foram observadas: i) uma mutação sinónima germinativa c. 213 CGA>CGG (Arg>Arg), encontrada em 2 lesões de dimensões 6-9mm, biopsadas do cólon sigmoide e cólon descendente do mesmo indivíduo, ambas com caracterização histológica de adenoma tubular séssil com displasia de alto grau; ii) uma transição somática c. 273 CGT>CAT(Arg>His), em adenoma tubular séssil com displasia de alto grau e adenoma viloso séssil com displasia de alto grau, ambos com dimensão ≥ 10 mm e biopsados no reto; iii) mutações intrónicas somáticas I5 pb14G>A e I8 pb10C>A em dois pólipos hiperplásicos sésseis serreados, com ≥ 10 mm e 6-9mm, biopsados no cego e cólon descendente, respetivamente; iv) uma mutação intrónica germinativa I9 pb12T>C, ocorrendo em simultâneo com a mutação somática c. 273 CGT>CAT(Arg>His) numa das lesões no mesmo indivíduo.

Se se considerarem positivas as análises de DNA em que pelo menos um dos marcadores do painel apresenta mutação somática, obtêm-se os resultados sumarizados na Tabela 5.3. A positividade do painel genético, de cerca de 53,3% para a totalidade das amostras (16 em 30), não se revelou estatisticamente significativa para nenhuma das categorias consideradas. Não foram detetadas mutações somáticas em *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* ou *TP53* nos adenocarcinomas bem diferenciados. Além disso, apenas um adenoma tubular com displasia de alto grau, com dimensão ≥ 10 mm, biopsado no reto apresenta mutações somáticas simultâneas nos marcadores em estudo, nomeadamente em *APC* e *TP53*.

À exceção das mutações em *B-RAF* c.600 que não foram detetadas, os resultados por PCR em Tempo-Real com *kit* comercial estão em consonância com os obtidos por sequenciação para as mesmas amostras, tendo sido automaticamente detetados pelo software de análise.

Ao contrário das análises moleculares em fragmentos de tecido biopsado e no sangue, a pesquisa em DNA fecal não detetou nenhuma destas alterações somáticas mas sim a informação germinativa de cada indivíduo (determinada no DNA de sangue), pelo que invalida a avaliação da sensibilidade do DNA fecal em identificar lesões cólicas.

Tabela 5.3 Positividade do painel genético de acordo com a classificação histológica, localização e dimensão das lesões colorretais

	Painel genético positivo	Total	χ^2/p
<i>Classificação histológica</i>			
Adenocarcinoma bem diferenciado	0	4	nd
Adenoma tubular séssil com displasia alto grau	7	12	0.94
Adenoma viloso séssil com displasia alto grau	1	1	nd
Adenoma tubular séssil com displasia baixo grau	2	3	0.90
Pólipo hiperplástico séssil	1	3	0.90
Pólipo hiperplástico séssil serreado	5	7	0.50
<i>Localização</i>			
A-C Reto	6	10	0.89
D Cólon sigmoide	3	8	0.52
E Cólon descendente	1	2	0.52
F-H Cólon transversos	3	5	0.87
I Cólon ascendente	1	3	0.90
J.K Cego	2	2	nd
<i>Dimensão</i>			
6-9 mm	3	8	0.52
≥ 10 mm	13	21	0.30
Lesão plana 3	0	1	nd

5.4.2 Análise de L-DNA em amostras fecais

Para o universo de 192 amostras de DNA fecal analisadas para este marcador molecular, foram obtidos os resultados que constam da Tabela 4.4. A positividade de L-DNA é indicada pela presença do fragmento de 1300pb, sendo que os resultados foram apenas considerados quando ocorreu a amplificação simultânea do fragmento S-DNA de 120pb, usado como controlo de amplificação (Figura 5.1). A análise comparativa da positividade de L-DNA nos grupos de amostras definidos de acordo com a presença ou ausência de lesões, não revelou associação estatisticamente significativa (16,8% e 15,5% respetivamente; $p=0,84$, OR=1,10, IC a 95%=0,513-2,389). A sensibilidade e especificidade deste marcador em detetar lesões cólicas na amostra, ficam-se assim pelos 16,84% e 84,54% (ou 13,89% e 84,54% respetivamente, na deteção de adenomas ≥ 6 mm e lesões malignas). Com a análise dos resultados de L- DNA por classificação histológica, dimensão e região de localização da lesão mais avançada, não se verificou qualquer significância estatística (valor $p>0,05$). Por outro lado, há uma tendência para que o L-DNA seja mais frequentemente detetado em indivíduos com um maior número de lesões cólicas (L-DNA positivo em 13,4% das amostras com 1 a 2 lesões vs 38,5% das amostras com 3 a 5 lesões; $p=0,06$; OR=3,95, IC a 95%=1,01-14,67). É também encontrada uma associação de L-DNA às lesões poliposas na globalidade comparativamente com os pólipos apenas adenomatosos (L-DNA positivo em 28,57% pólipos vs 8,89% em adenomas; $p=0,03$, OR=4,03, IC a 95%=1,22-15,76).

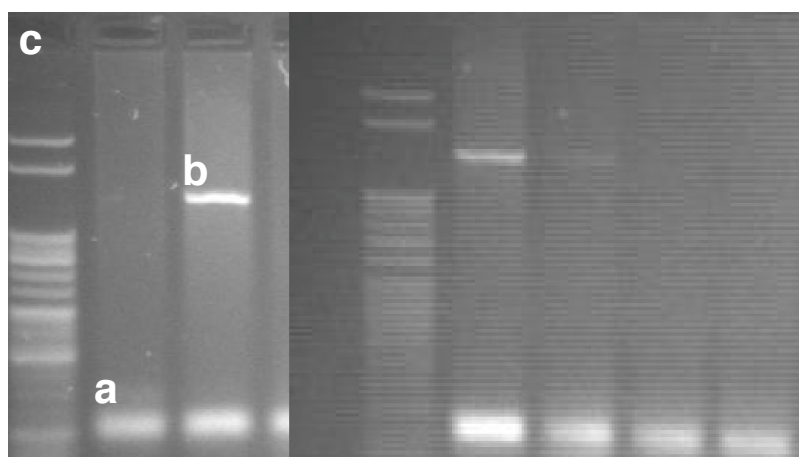


Figura 5.1 Eletroforese de produtos de amplificação para análise de DNA Longo em amostras fecais em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (80V, 40mins). a) S-DNA 120 pb, b) L-DNA 1300 pb, c) marcador de tamanho *O'Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use* (Fermentas, Lituania)

A presença/ausência de lesões cólicas detetadas por colonoscopia ótica revelou-se associada ao sexo (Regressão logística B= -0,62, p=0,03; Qui-quadrado p=0,04, OR=0,53; IC a 95%=0,29-0,94), sendo mais frequentes nas amostras do sexo feminino (22,0% vs 11,1% no sexo masculino). A análise foi assim subestruturada de acordo com o sexo não tendo sido encontradas associações, à exceção da deteção de L-DNA ser significativamente mais frequente em amostras do sexo feminino com 3 a 5 lesões, quando comparada com a taxa de deteção em amostras com 1 a 2 lesões (dados não apresentados, 62,5% vs 14,3% p=0,01, OR=9,33, IC a 95%=1,73-59,10). Em alternativa, tomou-se também por referência os resultados da colonoscopia ótica de amostras com apenas 1 lesão (n=132) e da colonoscopia virtual (n=192), para análise dos resultados de L-DNA com as mesmas variáveis acima consideradas. Não foi revelada nenhuma associação estatisticamente significativa (Tabelas Suplementares L- DNA 1 e L-DNA 2, respetivamente) (Anexos 10 e 11).

Tabela 5.4 Positividade do marcador molecular L-DNA de acordo com as características da amostra e das lesões mais avançadas (colonoscopia ótica)

		L-DNA		χ^2 /teste t	p	OR	(IC a 95%)	RL ^{a)}	
		Negativo (n=161)	Positivo (n=31)					B	p
Sexo	Masc/ Fem (% Masc)	69/92 (42,8)	17/14 (54,8)	1,50	0,24	0,61	(0,28-1,33)	-0,62	0,03
Idade	Média anos (d.p.)	59,6 (6,1)	58,3 (6,9)	1,09	0,27			0,04	0,07
Presença de lesões	Com lesões %	79 (83,2)	16 (16,8)	0,06	0,84	1,10	(0,51-2,38)		
	Sem lesões %	82 (84,5)	15 (15,5)						
Lesão mais avançada	Dimensão %								
	1-5mm	48 (81,4)	11 (18,6)	0,40	0,81				
	6-9mm	17 (85,0)	3 (15,0)						
	>9mm, maligna	14 (87,5)	2 (12,5)						
	Região								
	Recto	26 (92,9)	2 (7,1)	5,72	0,33				
	Cólon sigmóide	19 (79,2)	5 (20,8)						
	Cólon descendente	10 (76,9)	3 (23,1)						
	Cólon transverso	11 (68,8)	5 (31,3)						
	Cólon ascendente	7 (77,8)	2 (22,2)						
	Cego	5 (100,0)	0 (0,0)						
	Caraterização histológica) ^{b)} %								
	Adenocarcinoma bem diferenciado	3 (100,0)	0 (0,0)	7,09	0,13				
	Adenoma titular séssil com displasia alto grau	14 (82,4)	3 (17,6)						
	Adenoma tubular séssil com displasia baixo grau	27 (96,4)	1 (3,6)						
	Pólipo hiperplásico séssil	21 (72,4)	8 (27,6)						
	Pólipo hiperplásico séssil serreado	9 (75,0)	3 (25,0)						
	Adenoma	41 (91,1)	4 (8,9)	4,37	0,03	4,03	(1,22-15,76)		
	Pólipo	30 (71,4)	12 (28,6)						
	Nº Lesões								
	1-2	71 (86,6)	11 (13,4)	3,29	0,06	3,95	(1,01-14,67)		
	3-5	8 (61,5)	5 (38,5)						

Os valores -p<0,05 encontram-se destacados a negrito

^{a)} Regressão logística, variável 'Presença de lesões', método B-step (Wald), com L-DNA, Sexo e Idade

^{b)} Na caraterização histológica, não foram considerados classes com n<3

5.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na componente molecular do presente estudo procedeu-se à pesquisa de mutações somáticas em DNA extraído de tecido, sangue e fezes em regiões génicas de *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53* selecionadas de entre as mais frequentemente alteradas na progressão adenoma-carcinoma colorretal. Contudo, desde cedo evidenciaram-se sérios comprometimentos à realização desta intenção, uma vez que as condições de amplificação por PCR e de sequenciação das amostras revelaram-se de ajuste quase individual. Adicionalmente e de acordo com o referido em Lin et al (2007)¹⁹⁵ e van Krieken et al (2008)¹⁹⁶, verificou-se que a técnica de sequenciação por dideoxinucleótidos terminadores e os equipamentos automáticos *ABI310* e *ABI 3730XL* apenas detetam variantes de DNA que estão representadas em mais de 30% do material genético em análise (dados não apresentados, o que impõe limitações à deteção de mutações somáticas. Reformulou-se então a estratégia inicial reduzindo a análise a um subgrupo de 30 amostras selecionadas de entre 24 participantes no rastreio em vários estádios de progressão da lesão, e classificadas de acordo com a sua dimensão, localização e caracterização histológica. Iniciou-se a análise molecular dos DNAs extraídos de tecido e sangue e, quando detetadas mutações somáticas, estas foram pesquisadas no DNA fecal correspondente.

A ausência de mutações em *APC* nos carcinomas estudados não se enquadra nos valores apresentados em estudos anteriores com uma frequência de mutações de 50% a 83% em CCR esporádico^{144,145}. Por outro lado, se considerarem as classes adenoma tubular sésil com displasia de alto grau e pólipo hiperplástico sésil, as mutações em *APC* chegam a representar 33% de cada classe. Esta proporção em estádios menos avançados, acusando a importância de *APC* na iniciação da displasia mas não na sua progressão, está de acordo com a literatura^{30,34,75,146}, e com as proporções indicadas na base de dados *COSMIC* (35% em adenomas do cólon e 43-56% em adenomas do reto)^{112,113}. No presente estudo, revelou-se serem mais frequentes as mutações *nonsense* (57%), surgindo em menor número as mutações *frameshift* (28%) e *missense* (14%). Estes dados são concordantes com estudos anteriores onde 95% das mutações encontradas correspondiam a alterações *frameshift* e *nonsense*^{48,147}.

Tendo em conta os domínios funcionais e estruturais de *APC*, a literatura descreve que mutações patogénicas ocorrem sobretudo nos primeiros 3 domínios de regulação da β -catenina (em c. 1256-1510) e na primeira repetição SAMP em c. 1569^{48,148,149,151}, originando proteínas truncadas estáveis que conseguem manter entre zero a três domínios de ligação à β -catenina⁴⁸. De entre as mutações identificadas na presente amostra, as *nonsense* c.1286

GAA>TAA(Glu>STOP), c.1294 CAG>TAG(Gln>STOP), c.1306 GAA>TAA(Glu>STOP), e c.1309 GAA>TAA(Glu>STOP), e a *frameshift* c.1319 CCT>delC(Pro>Leu Fs*2) geram proteínas truncadas com apenas um domínio de regulação. Por outro lado, a mutação *frameshift* c.1398 AGT>delAG(Arg>Phe Fs*9) situa-se entre a segunda e terceira repetição 20 AAR, originando uma proteína com dois domínios de regulação⁴⁸. Estudos *in vitro* parecem demonstrar que proteínas truncadas com dois ou três domínios de regulação mantêm atividade residual considerável, podendo reduzir a expressão de β -catenina de forma quase tão eficiente como a proteína APC, regulando assim a divisão celular^{35,150-153}. Por outro lado, aquelas com apenas um domínio de regulação da β -catenina têm uma atividade residual, insuficiente para manter os níveis de β -catenina embora mantenham capacidade de exportá-la do núcleo^{35,154,155}. Com a inativação do oncosupressor *APC*, há um aumento β -catenina livre e a via de sinalização Wnt fica constitutivamente ativa, incitando o progresso do ciclo celular. Segundo o modelo *just-right signalling*, a manutenção de proteína APC truncadas com actividade residual parece conferir uma vantagem selectiva à progressão tumoral, comparativamente à completa inactivação de *APC*^{35,49,144,149,151}. Assim, as lesões em que foram encontradas mutações que mantêm apenas um domínio de regulação podem ser alvo de seleção positiva e evoluir para a neoplasia colorretal. Na verdade, as mutações c.1286 GAA>TAA (Glu>STOP), c.1306 GAA>TAA (Glu>STOP), c.1294 CAG>TAG (Gln>STOP), c.1309 GAA>TAA (Glu>STOP e C.1319 CCT>delC (Pro>Leu Fs*2) correspondem a cerca de 4% das mutações reportadas nas bases de dados COSMIC, sobretudo em CCR e adenomas médios e avançados^{112,113}. No que respeita à mutação *missense* c.1317 GAA>CAA(Glu>Gln), e muito embora não se localize num dos domínios funcionais reconhecidos, demonstrou-se em alguns estudos que suprime a via APC/ β -catenina, conferindo assim um risco aumentado para lesões colorretais e CCR^{187,188,189-191}. Na região analisada, nenhuma amostra apresentou um segundo evento mutacional em *APC*, contudo, há que considerar que raramente ambos ocorrem em MCR¹⁴⁴ e que, com a metodologia utilizada, não é possível avaliar as perdas de heterozigotia.

APC c.1493 ACG>ACA (Thr>Thr) é um polimorfismo frequentemente encontrado em 40-56% das populações europeias (MAF_G=0.338, rs41115; NCBI dbSNP)¹⁵⁶⁻¹⁵⁹, que como tal, está representado em indivíduos com e sem lesões colorretais. Na presente amostra, este polimorfismo surge em 79,2% dos indivíduos analisados, dos quais 49,5% em heterozigotia e 29,7% em homozigotia, concordando com estudos anteriores onde se assevera a alta frequência da heterozigotia em indivíduos normais e em CCR familiar esporádico (42,2% - 54,3%)¹⁵⁷. Salvaguarda-se aqui o interesse de no futuro realizar um estudo caso-controlo na população da Madeira com o intuito de se avaliar a associação deste polimorfismo ao risco de lesões colorretais.

As mutações encontradas em K-RAS c.12 GGT(Gly) e c.13 GGC(Gly) listadas na Tabela 4.2, representam 13% das amostras analisadas, entre as quais 26% dos adenomas tubulares sésseis. Estas proporções estão de acordo com as encontradas noutros estudos⁷¹⁻⁷³, em que estes codões são *hotspots* mutacionais em 35-60% de CCR esporádico, 30-40% de adenomas do cólon e <25% de adenomas do reto e pólipos serreados com diferentes localizações^{74-77,112}. Estas alterações particulares representam 84% de todas as mutações somáticas descritas na literatura e bases de dados da especialidade: c.12 GGT>GAT(Gly>Asp) foi observada em 30% das lesões do pâncreas e 12-14% das lesões do trato biliar e colorretais¹⁶⁹; c.12 GGT>GTT(Gly>Val) está presente em 18% das lesões do pâncreas e 5-8% das lesões do cólon, trato biliar, ovário e endométrico¹⁶⁹ e foi associada a uma forma mais agressiva, com falha no tratamento com anticorpos anti-EGFR e baixa sobrevivência¹⁹⁷; c.12 GGT>TGT (Gly>Cys) foi identificada em 3-7% dos cancros do pulmão e CCR¹¹²; c.13 GGC>GAC (Gly>Asp) está presente em 3-6% das lesões em tecidos moles e CCR¹¹². A ativação constitutiva do efeito oncogénico de *K-RAS* por alteração destes resíduos em *GTP-binding-pocket* é mais frequente em estádios patológicos mais avançados, daí pareça ser importante para a progressão do CCR, mas não para a sua iniciação^{71,73,74,77,81,160}, para além de que se associa a uma sobrevivência mais curta⁷⁸. As mutações identificadas neste estudo estão presentes em 3 adenomas tubulares sésseis com displasia de alto grau, no reto, cólon sigmoide e cólon ascendente, com dimensão ≥ 10 mm e 1 adenoma tubular sésil com displasia de baixo grau no cólon transversal, com dimensão ≥ 10 mm, estando ausentes nos adenocarcinomas bem diferenciados. Apesar do baixo número de indivíduos analisados, a sua presença em lesões com a mesma caracterização histológica pode sugerir que uma das vias de transformação dos adenomas tubulares sésseis é *K-RAS*-dependente.

Foram detetadas duas alterações somáticas em *B-RAF* c.600 GTG>GAG (Val>Glu) em dois pólipos hiperplásicos sésseis serreados. Estudos anteriores reportam já uma associação desta mutação particular à via de diferenciação de lesões hiperplásicas serreadas^{98,99,162,163}. Acredita-se que nesta mutação o domínio serina-treonina cinasa (resíduos 457-714) mimifica a fosforilação do domínio de ativação N-terminal de *B-RAF*, também um efetor da via *RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK*, promovendo uma ação cinática máxima e constitutiva sobre os seus alvos¹⁶¹. Células com alterações oncogénicas em *B-RAF* tornam-se assim alvo de uma forte seleção funcional para o crescimento de tumores. No entanto, a maior frequência em lesões não malignas (30% vs 10-18% em CCR) sugere a ativação de *B-RAF* como um evento precoce na tumorigénese mas que nem todos progredem para cancro^{71,73}, podendo necessitar de outros fatores genéticos e epigenéticos para a transformação maligna^{71,97}. Na verdade, a ocorrência de *B-RAF* mutado na transformação maligna com sequência pólipo hiperplásico serreado-carcinoma é muitas vezes associada a instabilidade de microssatélites e metilação^{71,54,162-165},

mas que não nos foi possível determinar no presente estudo. A literatura refere ainda que nas lesões não malignas *B-RAF* e *K-RAS* são mutuamente exclusivas, já que a sua coexistência parece ser incompatível com a proliferação^{78,166}, o que se observa também nas amostras analisadas, apesar do seu baixo número.

O valor de *K-RAS* e *B-RAF* como marcadores de rastreio para a patologia colorretal não está bem estabelecido, dado que alterações em *K-RAS* são também observadas em células hiperproliferativas não neoplásicas⁸³ e uma fração considerável das lesões com mutações em *B-RAF* não progridem para neoplasia^{71,97}. Por outro lado, o seu valor clínico na seleção da terapia é claro, pois algumas das suas mutações conferem resistência aos fármacos *Cetuximab* e *Panitumumab*, anticorpos monoclonais anti-EGFR^{80,86-89}, por tornarem as vias sinalizadoras *RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK* e *PIK3CA/AKT* constitutivamente ativas. Assim, alterações neste *loci* indicam ausência ou má resposta, pior prognóstico e uma menor taxa de progressão e sobrevivência, quando tratados com estes fármacos^{100,10}. A Sociedade Americana de Oncologia Clínica emitiu em 2009 uma Opinião Clínica Provisional, sugerindo que todos os potenciais pacientes para terapia anti-EGFR sejam rastreados para mutações somáticas em *K-RAS*¹⁶⁸, otimizando-se assim recursos e evitando-se o pouco ou nenhum benefício em cerca de 40-50% de casos de CCR. Foi recentemente proposto que, adicionalmente, deve ser considerado o estado mutacional de *B-RAF*, *PIK3CA* e *PTEN*^{78,100,102}.

A utilização de um ensaio de PCR em Tempo Real objetivava contornar parcialmente as limitações de deteção das técnicas e equipamentos, já que o fabricante anuncia a deteção de variantes de DNA que estejam representadas em <1% da mistura e um maior sucesso em amostras com algum grau de degradação de DNA. O ensaio identificou e confirmou a totalidade das mutações *K-RAS* sequenciadas em tecidos mas não detetou nenhuma das 2 mutações *B-RAF*. Note-se que, apesar da literatura e empresas da especialidade referirem mais de 60 métodos de deteção de mutações em *K-RAS* e *B-RAF*, poucos se encontram validados pela Comunidade Europeia¹⁶⁷ e o utilizado não se encontra entre os referidos.

De uma forma geral, prevê-se que a pesquisa de mutações em *TP53* seja útil na deteção de lesões precoces, em estádios pré-malignos mas com elevado risco de evolução para neoplasia, assim como indicador de um prognóstico mais reservado dada a natureza mais agressiva do tumor^{78,120,145,146,174-176}. A análise de *TP53* (c.126-331) identificou 3 mutações na região codificante e 3 mutações em regiões intrónicas em lesões de alto grau, para as quais é importante esclarecer o seu significado biológico. A mutação sinónima germinativa *TP53* c.213 CGA>CGG (Arg>Arg), identificada em heterozigotia num dos indivíduos analisados e lesões respetivas, está presente em 2-11% das populações europeias (MAF_G=0.016;

rs1800372; NCBI dbSNP). Embora outras mutações somáticas neste mesmo codão tenham sido associadas a neoplasias colorretais^{110,171} e os estudos funcionais mostrem o seu efeito deletério na ação de p53^{169,170}, não existe qualquer evidência de associação de c.213 CGA>CGG (Arg>Arg) à suscetibilidade de CCR.

A mutação somática c.273 CGT>CAT (Arg>His; rs28934576 NCBI dbSNP) é considerada um *hotspot* mutacional em *TP53*, fazendo-se representar em 5-11% dos CCR bem como noutros tumores^{110,112,113,171}, o que revela a ausência de uma associação particular ao epitélio intestinal. Pelo seu efeito dominante negativo, esta mutação que altera um ponto de contato em *DNA-binding domain* escapa à inativação bialélica dos oncossuppressores e revela-se deletéria para a ação de p53 em cascatas moleculares para reparação do DNA, paragem do ciclo celular ou apoptose^{114,115}. Com o desenho experimental adotado não é possível avaliar a perda de heterozigotia (LOH), que surge frequentemente em paralelo a alterações em c.273^{154,155,172}. Na região não codificante, à exceção de I9 pb12T>C que se verificou tratar de um polimorfismo (MAF_C=0.017, rs1800899, NCBI dbSNP), as restantes alterações não se encontram descritas na literatura e não constam como alterações somáticas ou germinativas na base de dados *IARC*. Apesar de não integrarem a sequência consenso de *splicing*¹²⁵, estas alterações podem interferir com o processamento do mRNA e alterar os transcritos de *TP53*. Curiosamente, ambas as mutações intrónicas foram encontradas em dois pólipos hiperplásicos sésseis serreados, localizados no cólon descendente e no cego, pelo que podem indicar um perfil de mutações pontuais distinto para a evolução deste tipo de lesão colorretal. O valor clínico da análise genética de *TP53* é ainda considerado controverso¹⁷⁷⁻¹⁸¹, uma vez que os mutantes são funcionalmente heterogéneos e a sua interpretação clínica não é universal, já que requer um conhecimento crescente da estrutura da proteína e dos complexos mecanismos de ação¹¹¹. Melhor estabelecido está o seu papel na seleção da intervenção farmacológica: muitos estudos referem tumores p53-mutados como resistentes à terapia com 5-fluoracilo^{78,174-176} e outros descrevem a utilização de moléculas que reativam os oncossuppressores das células tumorais¹⁷⁵.

TP53 c.72 CGC>CCC (Arg>Pro) é o polimorfismo mais amplamente analisado em *TP53*, no contexto da variação genética e suscetibilidade para cancro^{180,181}. Este polimorfismo (MAF_G=0.393, rs1042522, NCBI dbSNP) está presente em mais de 70% das populações caucasianas e, embora as associações difiram entre grupos populacionais¹⁷⁴, alguns estudos relatam associações positivas dos homozigóticos c.72 Pro>Pro com CCR^{174,183}. Esta variante c.72Arg tem uma capacidade 15 vezes superior em induzir a apoptose do que c.72Pro, provavelmente devido à maior capacidade de interagir com MDM2, que facilita a sua exportação nuclear e localização mitocondrial¹⁸². Ressalva-se assim o interesse de numa oportunidade futura se analisar o polimorfismo c.72 CGC>CCC (Arg>Pro) numa amostra

caso-controle para a patologia colorretal.

A sensibilidade do painel de marcadores deste estudo em detetar lesões colorretais, de cerca de 54%, revelou-se dentro dos limites reportados por outros grupos de trabalho^{73,79} embora, curiosamente, não foram detetadas quaisquer mutações nos adenocarcinomas bem diferenciados. Esta observação deve-se com certeza ao baixo número de adenocarcinomas analisados e sugere que estas lesões malignas particulares tenham alterações em regiões não analisadas ou tenham seguido uma via carcinogénica independente de *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* ou *TP53*. Apenas uma das lesões avançadas estudadas apresentou duas mutações somáticas cumulativas em *APC* e *TP53*, nomeadamente um adenoma tubular sésil com displasia de alto grau. A existência de mutações em *APC* e *TP53* é a combinação mais frequente no estudo de Jeon et al (2008)⁷⁵, tendo sido encontrada em 15.4% dos tumores analisados. apesar de existir evidência da ação sinérgica de *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53* para a transformação maligna^{184,185}, estes resultados estão em concordância com estudos anteriores, que verificaram que a acumulação de mutações nestas regiões não é um pré-requisito para o desenvolvimento de lesões colorretais e CCR esporádico^{74,77,185,186}. Os resultados em Frattini et al (2004)⁷⁶ indicam que cerca de 90% dos tumores apresentam mutações em pelo menos um destes genes, 27% dos quais em apenas um gene, 23% em *APC+K-RAS+TP53*, 21% em *APC+K-RAS* e 18% em *APC+TP53*.

Ao contrário do que reportam estudos anteriores^{29,122,123}, não se encontrou associação de L-DNA à patologia colorretal, em adenocarcinomas ou adenomas e pólipos de várias dimensões e localizações cólicas. Adicionalmente, a sensibilidade e especificidade do L-DNA fecal na deteção de adenomas ≥ 6 mm e adenocarcinomas (13,89% e 84,54%) encontram-se muito aquém do reportado (64% e 95% respetivamente)²⁹. Assim, o marcador molecular L-DNA não se evidenciou como um bom método para rastreio não invasivo de lesões colorretais nas nossas amostras fecais. É no entanto de salientar a maior frequência de L-DNA em lesões poliposas quando consideradas globalmente (28,6%), comparativamente aos pólipos adenomatosos (8,9%), podendo refletir uma associação particular a este tipo de lesão com uma probabilidade 4x superior de L-DNA positivo identificar um pólio (valor $p=0.036$; $OR=4.035$, 95% $IC=1.220-15.760$). Além disso, há uma tendência para que seja mais frequente em indivíduos com maior número de lesões cólicas (38,5% vs 13,4%), estando significativamente associados a amostras do sexo feminino com 3 a 5 lesões cólicas (62,5%, quando comparadas com 14,3% em amostras com 1 a 2 lesões). Na interpretação dos resultados acima referidos, não se pode descuidar que a positividade de L-DNA pode ter origem em lesões ou fonte hemorrágicas na porção superior do trato digestivo ou em doença inflamatória do intestino¹⁸⁷.

Um dos objetivos futuros é o de avaliar a integridade do DNA fecal por qPCR em Tempo Real, como descrito em Zou et al 2006¹²⁵ e Zhang et al 2012¹²⁴. De acordo com os seus resultados, em que os níveis de L-DNA são significativamente mais elevados em pacientes com CCR do que em indivíduos sem lesões (49 vs 5ng/g DNA fecal, $p<0.001$), esta é uma abordagem bastante promissora, rápida, de baixo custo e cuja sensibilidade é semelhante a muitos painéis multimarcaadores^{31,77}. Os resultados obtidos no presente estudo têm uma interpretação muito limitada, tendo em conta as dificuldades metodológicas e a reduzida representatividade do universo amostral, no que respeita a diferentes classes de dimensão, localização e caracterização histológica das lesões. Entre as dificuldades metodológicas destacam-se a baixa sensibilidade da sequenciação automática em identificar espécies raras de DNA (inferiores a 30% de uma mistura) e a falha na análise do DNA fecal, por não ter sido possível fazer o enriquecimento das regiões-alvo do estudo (à semelhança de procedimentos descritos em^{27,72,79,123}). Note-se que se estima que o DNA humano represente cerca de 1% do DNA fecal total e que, como tal, a fração mutada seja significativamente inferior. Não obstante o limitado valor dos resultados, sugeriu-se uma monitorização regular dos indivíduos em que se identificaram mutações somática em *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* ou *TP53* e que a literatura associa a um risco de progressão para neoplasia ou que auxiliam na seleção da terapia.

6. CONCLUSÕES

O cancro colorretal esporádico, de baixo a médio risco, representa 80 % de casos, e assume-se atualmente como a segunda ou terceira causa de morte por cancro, no mundo ocidental. A introdução de métodos de rastreio não invasivos e com maior fiabilidade e sensibilidade é uma medida urgente, com vista à deteção precoce de lesões avançadas, sobretudo pré-malignas, com importante interferência na prevenção do cancro colorretal, e com grande repercussão em Saúde Pública, não só em termos de melhoria da qualidade de vida das populações, como em termos de poupança financeira no erário público.

A colonoscopia ótica é o exame que permite fazer o diagnóstico formal do cancro colorretal assim como das lesões pré-cancerosas. Contudo, é impossível executar regularmente este exame a todos os indivíduos, num programa de rastreio nacional, pelos custos humanos, financeiros e por algumas complicações graves, não negligenciáveis, resultantes da sua aplicação. A introdução da tomografia computadorizada helicoidal e de potentes computadores nas estações de trabalho para tratamento da imagem radiológica permitiu o aparecimento da colonoscopia virtual, com um potencial excecional para utilização alargada em rastreios populacionais do cancro colorretal.

A fraca sensibilidade dos testes de pesquisa de sangue oculto nas fezes, estimada entre 25% e 50%, motivou o desenvolvimento de diferentes técnicas de extração do DNA a partir das fezes. O DNA é relativamente estável nas fezes e mutações pontuais são já identificadas em adenomas cólicos, para além dos casos de cancro. Em oposição aos testes baseados na presença de sangue nas fezes, a análise de DNA fecal é facilitada pela libertação de células do lúmen cólico de forma regular devido à renovação celular e porque o DNA alterado é sempre de origem tumoral.

Pretendeu-se avaliar a utilização da colonoscopia virtual e da deteção de DNA fecal, como métodos de rastreio do cancro colorretal em indivíduos de risco médio, entre os 50 e os 74 anos de idade, e o seu impacto na população madeirense. Resumidamente:

1- Neste estudo, a colonoscopia virtual evidenciou um poder diagnóstico robusto com uma elevada sensibilidade para a presença ou ausência de lesões cólicas: identificou 98.1% de indivíduos com adenomas ≥ 6 mm, 98% das lesões 6 a 9 mm e 100% de pólipos ≥ 10 mm. Inclusivamente, a colonoscopia virtual detetou mais adenomas ≥ 6 mm do que a colonoscopia ótica. A maioria de falsos negativos da colonoscopia ótica localizou-se no cólon direito, área onde a colonoscopia virtual se revelou um exame com melhores resultados, como também

referido em vários estudos internacionais, e reconfirmados por colonoscopias virtuais de revisão, executadas no decurso do estudo. Ficou também evidente a importância do uso da teleradiologia, que permite a leitura das películas radiográficas por especialista localizado em local remoto, ao contrário da colonoscopia ótica em que a execução de cada exame necessita sempre da intervenção dum especialista;

2- Com utilização de metodologia apropriada, avaliou-se e comparou-se o impacto na população das colonoscopias virtual e ótica. Os rastreados aceitaram bem a realização dos dois exames no mesmo dia e de forma sequencial (99.6% aceitação). O estudo revelou que na generalidade houve satisfação com ambos os exames, sem manifestações de grande ansiedade ou receios (9 e 10%, respetivamente) e com uma perceção positiva da eficácia dos mesmos (98.2% e 99.2%, respetivamente). Há uma tendência para maior satisfação com a colonoscopia virtual, mas que se revela importante confirmar em futuras investigações. Há indícios que parecem apontar para uma associação entre a perceção da eficácia dos exames com a satisfação para com estes, e ainda que a satisfação com a colonoscopia virtual ou com a colonoscopia ótica se relacionou inversamente com a ansiedade e os receios para com estes exames médicos ($0.63 < \alpha \text{ de Cronbach} < 0.79$).

Encontraram-se ainda diferenças de género, sendo que os homens pareceram estar um pouco mais satisfeitos com a colonoscopia ótica e as mulheres manifestaram mais receios e ansiedade em relação a ambos os exames.

Uma das vantagens desta investigação foi a realização dos questionários de satisfação imediatamente a seguir à realização dos dois exames, evitando-se que os participantes tivessem tido tempo de controlar as suas emoções.

A desejabilidade social teria sido um fator importante a controlar neste estudo para avaliar a influência da gratuidade dos exames na valorização que os indivíduos fizeram da sua satisfação e eficácia das técnicas. Também teria sido importante controlar o uso do ansiolítico midazolam durante a execução da colonoscopia ótica, fator que, obviamente, enviesou em alguma percentagem, os valores da satisfação a favor da mesma;

3- A análise de DNA das lesões cólicas biopsadas no presente estudo produziu resultados que podem traduzir-se em importantes benefícios clínicos. De acordo com as bases de dados da especialidade e com a literatura mais recente, as alterações somáticas encontradas em *APC*, *K-RAS*, *B-RAF* e *TP53* são de interesse como complemento do diagnóstico, indicação para vigilância e seleção da terapia. As alterações nos oncosuppressores *APC* e *TP53* são comuns em estádios pré-malignos mas com elevado risco de evolução para neoplasia. Por outro lado,

as mutações ativadoras do proto-oncogene *K-RAS* encontram-se descritas mais frequentemente em fases mais avançadas e, em conjunto com *TP53*, associam-se a um pior prognóstico, com maior agressividade e sobrevivência mais curta. As mutações em *B-RAF* sugerem uma associação particular a pólipos hiperplásicos sésseis serreados. A determinação do marcador *L-DNA*, com os métodos aplicados, não se evidenciou como um marcador robusto para rastreio da patologia colorretal. No entanto, os resultados sugerem que esteja associado a amostras com maior número de lesões cólicas, em particular no sexo feminino.

Os resultados da análise de DNA têm de ser interpretados de forma muito cautelosa e requerem estudos futuros. Em primeira instância, é necessário ter em conta que o universo amostral analisado é bastante reduzido, o que limita as ilações e a associação de mutações em regiões genómicas particulares à dimensão, localização ou classificação histológica da lesão. As limitações metodológicas evidenciadas no presente estudo comprometem também a sensibilidade do painel molecular, sobretudo do DNA fecal e, como tal, inviabilizam a sua aplicação ao rastreio da patologia colorretal. Além disso, o valor destes marcadores na patologia colorretal é complexo e pouco universal, já que é necessário um conhecimento crescente dos mecanismos de ação e estrutura das proteínas. Para além de se determinar a natureza germinativa ou somática da mutação, há que esclarecer o significado biológico das mutações, distinguindo-se as funcionalmente neutras das que possivelmente contribuem para a origem e progressão da lesão. É igualmente necessário ter em conta que muitas das alterações, sobretudo em *K-RAS* e *B-RAF*, são também observadas em células hiperproliferativas não neoplásicas e que nem todas progridem para neoplasia. Melhor estabelecido está o seu papel na escolha e racionalização da terapia farmacológica: tumores *TP53*-mutados são resistentes à terapia com 5-fluoracilo, assim como as mutações somáticas em *K-RAS* c.12 e c.13 e *B-RAF* c.600 conferem resistência aos fármacos Cetuximab e Panitumumab;

4- Os resultados obtidos permitem afirmar que a colonoscopia virtual é um método de estudo do intestino grosso com potencial interesse num programa de rastreio do CCR tão eficaz como a colonoscopia ótica, mas menos cruento, menos operador dependente e bem tolerado pela população. No entanto, são necessários estudos multicêntricos mais robustos que confirmem esta assunção. Os testes de DNA humano mutado nas fezes não são ainda aplicáveis como métodos de rastreio generalizado. A sua eventual função num programa de rastreio nacional está ainda por determinar.

Referências Bibliográficas

7.1 Introdução

1. Remontet L, Esteve J, Bouvier AM et al. (2003) Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Épidemiol Santé Publique* 51: 3-30
2. Registo Oncológico Nacional 2006. Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil-EPE. Lisboa 2012
3. Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Lasota MB, Coebergh JW, Santaquilani M and the EUROCARE working Group (2007) Survival for eight major cancers and all cancers combined for european adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCARE-4 study
4. Muto T, Bussey HJR, Morson BC (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36: 2251-70
- 5a. Morson BC & Dawson IMP (1990) Gastrointestinal Pathology. Blackwell Scientific Publications
- 5b. Iino H, Jass JR, Simms LA et al. (1999). DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol* 52: 5-9
- 5c. The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery (2007). Springer Science
- 5d. Regula J, Rupinski M, Kraszewska, E et al. (2006). Colonoscopy in Colorectal-Cancer Screening for Detection of Advanced Neoplasia. *N Engl J Med* 355: 1863-72
6. Bedenne L, Faivre J, Boutron MC et al. (1992) Adenoma-carcinoma sequence or “de novo” carcinogenesis? A study of adenomatous remnants in a population-based series of large bowel cancers. *Cancer* 69: 883-8
7. Gyrd-Hansen D, Sogaard J, Kronborg O (1998) Colorectal cancer screening: efficiency and effectiveness. *Health Econ* 7: 9-20
8. Advisory Committee on cancer prevention (2000) Recommendations on cancer screening in the European Union. *Eur J Cancer* 36: 1473-8

9. European Code Against Cancer (2005) http://www.cancercode.org/code_11.htm
10. Conference de consensus (1998) Prevention, depistage et prise en charge des cancers du colon. *Gastroenterol Clin Biol* 22: 205-26
11. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ et al. (1993) Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 328: 901-6
12. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN et al. (1993) Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 329: 1977-81
13. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L et al. (1997) Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 112: 594-642
14. Winawer SJ, Zauber AG (2002) The advanced adenoma as the primary target of screening. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, vol 12, pp 1-9
15. MacRae FA, St. John DJ (1982) Relationship between patterns of bleeding and hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas. *Gastroenterology* 82: 891-8
16. Ahlquist DA, McGill DB, Fleming JL et al. (1989) Patterns of occult bleeding in asymptomatic colorectal cancer. *Cancer* 63: 1826-30
17. Ahlquist DA (1997) FOB testing for colorectal cancer. Can we afford to do this? *Gastroenterol Clin North Am* 26: 41-55
18. Launoy G, Smith TC, Duffy SW et al. (1997) Colorectal cancer mass-screening: estimation of fecal occult blood test sensitivity, taking into account cancer mean sojourn time. *Int J Cancer* 73: 220-4
19. Jouve JL, Remontet G, Dancourt V et al. (2001) Estimation of screening test (Hemoccult) sensitivity in colorectal cancer mass screening. *Br J Cancer* 84: 1477-81
20. Young GP, St. John DJ, Winawer SJ, Rozen P, WHO (World Health Organization) and OMED (World Organization for Digestive Endoscopy) (2002) Choice of FOB tests for colorectal cancer screening: recommendations based on performance characteristics in

- population studies. *Am J Gastroenterol* 97: 2499-2507
21. Segnan N, Senore C, Andreoni B et al. and the Score Working Group (2002) Baseline findings of the italian multicenter randomized controlled trial of “once-only sigmoidoscopy” score. *J Natl Cancer Inst* 94: 1763-72
 22. Segnan V, Andreoni B, Bisanti L et al. (2004) Colonoscopy screening for CRC: a comparison study in Italy (abstract). *Gastroenterology* 126: A 198
 23. Segnan N, Senore C, Andreoni B et al. (2005) Randomized trial of different screening strategies for colorectal cancer: patient response and detection rates. *J Natl Cancer Inst* 97: 347-57
 24. Winawer SJ, Zauber AG, church T et al. (2002) National colonoscopy study preliminary results: a randomized controlled trial of general population screening colonoscopy (abstract). *Gastroenterology* 122: A 480
 25. Salked G, Solomon M, Short L et al. (2003) Evidence-based consumer choice: a case study in CRC screening. *Aust N Z J Public Health* 27: 449-55
 26. Cotton PB, Durkalski VL, Pineau BC et al. (2004) Computed tomographic colonography (virtual colonoscopy): a multicenter comparison with standard colonoscopy for detection of colorectal neoplasia. *Jama* 291: 1713-19
 27. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-67
 28. Bond JH (2001) Clinical relevance of the small colorectal polyp. *Endoscopy* 33: 454-7
 29. Vijan S, Inadomi J, Hayward RA et al. (2004) Projections of demand and capacity for colonoscopy related to increasing rates of colorectal cancer screening in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 20: 507-15
 30. Brown ML, Klabunde CN, Mysliwieck P (2003) Current capacity for endoscopic CRC screening in the United States: data from the National Cancer Institute survey of CRC screening practices. *Am J Med* 115: 129-33

31. Hixson LS, Fennerty MB, Sampliner RE et al. (1990) Prospective study of the frequency and size distribution of polyps missed by colonoscopy. *J Natl Cancer Inst* 82: 1769-72
32. Rex DK, Cutler CS, Lemmel GT et al. (1997) Colonoscopic miss rates of adenomas determined by back-to-back colonoscopies. *Gastroenterology* 112: 24-8
33. Morin MM, Kruskal JB, Farrell RJ, Goldberg SN, McGee JB, Raptopoulos V (1999) Endoluminal CT colonography after an incomplete endoscopic colonoscopy. *AJR* 172: 913-18
34. Vinning DJ, Gelfand DW (1994) Non-invasive colonoscopy using helical CT scanning. 3D reconstruction and virtual reality. Syllabus. 23rd annual meeting Society of Gastrointestinal Radiologists, Maui, Hawaii
35. Hara AK, Johnson CD, Reed JE et al. (1996) Detection of colorectal polyps by computed tomographic colonography: feasibility of a novel technique. *Gastroenterology* 110: 284-90
36. Royster AP, Fenlon HM, Clark PD et al. (1997) CT colonoscopy of colorectal neoplasms; two-dimensional and three-dimensional virtual reality techniques with colonoscopic correlation. *AJR* 169: 1237-42
37. Fenlon HM, Nunes DP, Schroy PC et al. (1999) A comparison of virtual colonoscopy and conventional colonoscopy for the detection of colorectal polyps. *N Engl J Med* 341: 1496-1503
38. Brenner DJ, Georgson MA (2005) Mass screening with CT colonography: should the radiation exposure be of concern? *Gastroenterology* 129: 328
39. Edwards JT, Mendelson RM, Fritschi L et al. (2004) Colorectal neoplasia screening with CT colonography in average-risk asymptomatic subjects: community-based study. *Radiology* 230: 459-64
40. Pineau BC, Paskett ED, Chen J et al. (2003) Virtual colonoscopy using oral contrast compared with colonoscopy for detection of patients with colorectal polyps. *Gastroenterology* 125: 304-10

41. Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I et al. (2003) CT virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 349: 2189-98
42. Rockey DC, Paulson E, Niedzwiecki D et al. (2005) Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography and colonoscopy: prospective comparison. *Lancet* 365: 305-11
43. Dachman AH, Kuniyoshi JK, Boyle CM et al. (1998) CT colonography with three-dimensional problem solving for detection of colonic polyps. *Am J Roentgenol* 171: 989-95
44. Hara AK, Johnson CD, Reed HE et al. (1997) Detection of colorectal polyps with CT colonography: initial assessment of sensitivity and specificity. *Radiology* 205: 59-65
45. Pescatore P, Glucker T, Delarive J et al. (2000) Diagnostic accuracy and interobserver agreement of CT colonography (virtual colonoscopy). *Gut* 47: 126-30
46. Macari M, Bini EJ, Jacobs SL et al. (2004) Significance of missed polyps at CT colonography. *Am J Roentgenol* 183: 127-34
47. Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, Schindler WR (2004) Non-adenomatous polyps at CT colonography: prevalence, size distribution and detection rates. *Radiology* 232: 784-90
48. Gluecker TM, Fletcher JG, Welch TJ et al. (2004) characterization of lesions missed on interpretation of CT colonography using a 2D search method. *Am J Roentgenol* 182: 881-9
49. Yoshida H, Nappi J (2001) Three-dimensional computer-aided diagnosis scheme for detection of colonic polyps. *IEEE Trans Med Imaging* 20: 1261-74
50. Summers RM, Johnson CD, Pusanik LM et al. (2001) Automated polyp detection at CT colonography: feasibility assessment in a human population. *Radiology* 219: 51-9
51. Yoshida H, Masutani Y, Maceneaney P et al. (2002) Computerized detection of colonic polyps at CT colonography on the basis of volumetric features: pilot study. *Radiology* 222: 327-36

52. Kiss G, Van Cleynenbreugel J, Thomeer M et al. (2002) Computed-aided diagnosis in virtual colonoscopy via combination of surface normal and sphere fitting methods. *Eur Radiol* 12: 77-81
53. Pickhardt PJ (2003) Three-dimensional endoluminal CT colonography: comparison of three commercially available systems. *Am J Roentgenol* 181: 1599-606
54. Mani A, Napel S, Paik DS et al. (2004) CT colonography: feasibility of computed-aided polyp detection in a “first reader” paradigm. *J Comput Assist Tomogr* 28: 318-26
56. Summers RM, Franaszek M, Miller TT et al. (2005) Computer-aided detection of polyps on oral contrast-enhanced CT colonography. *Am J Roentgenol* 184: 105-8
57. Lefere PA, Gryspeerdt SS, Dewyspelaere J et al. (2002) Dietary fecal tagging as a cleansing method before CT colonography: initial results polyp detection and patient acceptance. *Radiology* 224: 393-403
58. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA et al. (2000) colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 119: 1219-27
59. Osborn NK, Ahlquist DA (2005) Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology* 128: 192-206
60. Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H et al. (2004) Methylation changes in fecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 363: 1283-5
61. Rosenberg IL, Giles GR (1977) The value of colonic exfoliative cytology in the diagnosis of carcinoma of the large intestine. *Dis Colon Rectum* 20: 1-10
62. Boland CR, Sato J, Saito K et al. (1998) Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: review of the current models. *Cancer Detect Pre* 22: 377-82
63. Imperiale TF, Ransohoff DP, Izkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME (2004) Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 351: 2704-14

64. Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B (2002) Detection of proximal colorectal cancers through analysis of fecal DNA. *Lancet* 359: 403-4
65. Traverso G, Shuber A, Levin B et al. (2002) Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346: 311-20
66. Syngal S, Chung D, Willet C et al. (2002) Stool DNA analysis for the detection and follow-up of colorectal cancer (CRC) and advanced adenomas (AA): sensitivity in a prospective series. *Gastroenterology* 97: 332
67. Song K, Fendrick AM, Ladabaum U (2004) Fecal DNA testing compared with conventional colorectal cancer screening methods: a decision analysis. *Gastroenterology* 126: 1270-9
68. Kronborg O, Fenger C, Olsen J et al. (1996) Randomized study of screening for colorectal cancer with FOB test. *Lancet* 348: 1467-71
69. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH et al. (1996) Randomized controlled trial of FOB screening for colorectal cancer. *Lancet* 348: 1472-7
70. Waye JD, Kahn O, Auerbach ME (1996) Complications of colonoscopy and flexible sigmoidoscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 6: 343-77
71. Anderson ML, Pasha TM, Leighton JA (2000) Endoscopic perforation of the colon: lessons from a 10-year study. *Am J Gastroenterol* 95: 3418-22
72. Nelson DB, McQuaid KR, Bond JH et al. (2002) Procedural success and complications of large-scale screening colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 55: 307-14
73. Lefere P, Gryspeerdt S, Baert AL (2011). Virtual Colonoscopy: A Practical Guide (2nd Revised Edition). *Springer*
74. Wilson JM, Jungner F (1968). Principles and practice of screening for disease. *Public Health Papers n° 34*. Geneva: WHO
75. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis (first edition): overview and introduction to the full supplement publication.

- European Colorectal Cancer Screening Guidelines Wording Group. von Karsa J et al (2013 Jan). *Endoscopy* 45(1): 51-9. doi: 10.1055/s-0032-1325997. Epub 2012 Dec 4
76. Zalis ME, Barish MA, Taylor AJ (2005). Working Group on Virtual Colonoscopy. CT Colonography reporting and data system: a consensus proposal. *Radiology* 236: 3-9
77. Kudo SE, Lambert R, Allen JJ et al (2008). Non polypoid neoplastic lesions of the colorectal mucosa. *Gastrointest endosc* 68 (4 suppl): S3-47
78. Lambert R, Kudo SE, Vieth M et al (2009). Pragmatic classification of superficial neoplastic colorectal lesions. *Gastrointest endosc* 70 (6): 1182-99
79. Soetikno R, Kaltenbach T, eds (2010). Non-polypoid (Flat and Depressed) Colorectal Neoplasms. An issue of *The Gastrointestinal Endoscopy Clinics*. Philadelphia, PA. Saunders: 407-585
80. Hallmans G, Vaught JB (2011). Best practices for establishing a biobank. *Methods Mol Biol* 675:241-60
81. Zawati MH, Knoppers BM (2012). International normative perspectives on the return of individual research results and incidental findings in genomic biobanks. *Genet Med* 14(4):489-9
82. Caenazzo L, Tozzo P, Pegoraro R (2013). Biobanking research on oncological residual material: a framework between the rights of the individual and the interest of society. *BMC Med Ethics* 14:17
83. Rahm A, Wrenn M, Carroll NM, Feigelson HS (2013). Biobanking for research: a survey of patient population attitudes and understanding. *J Community Genet* Apr 20. (Epub ahead of print)
84. Black L, Avard D, Zawati MH, Knoppers BM, Hébert J, Sauvageau G; on behalf of the Leucegene Project (see Acknowledgments for the list of contributors) (2013). Funding considerations for the disclosure of genetic incidental findings in biobank research. *Clin Genet* May 10. Doi: 10.1111/cge. 12190 (Epub ahead of print)

7.2 Colonoscopia virtual

1. Levin B, Lieberman DA, McFarland EMG et al (2008). Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps. A joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 134:1570-95
2. Pickhardt P, Choi JR, Hwan I et al (2003). Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Eng J Med* 349:2191-2200
3. Kim DH, Pickhardt PJ, Taylor AJ et al (2007). CT Colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia. *N Eng J Med* 357:1403-12
4. Johnson CD, Chen MH, Toledano AY et al (2008). Accuracy of CT Colonography for detection of large adenomas and cancers. *N Eng J Med* 359:1207-17
5. Stoop EM, de Haan MC, de Wijkerslooth TR et al (2011). Participation and yield of colonoscopy versus non-cathartic CT Colonography in population-based screening for colorectal cancer: a randomized controlled trial. *Lancet Oncology* Published online November 15, DOI:10.1016/S1470-2045(11)70283-2
6. Liedenbaum MH, Bipat S, Bossuyt PM et al (2011). Evaluation of a standardized CT Colonography training program for novice readers. *Radiology* 258:477-87
7. Johnson CD, Herman BA, Chen MH et al (2012). The National CT Colonography Trial: assessment of accuracy in participants 65 years of age and older. *Radiology* 263:401-8
8. Laghi A, Iafrate F, Rengo M et al (2010). Colorectal cancer screening: the role of CT Colonography. *World J Gastroenterol* 16:3987-94
9. Thrall JH (2007). Teleradiology Part I. History and clinical applications. *Radiology* 243:613-17
10. Barneveld Binckhuysen FH, Ranschaert ER (2011). Teleradiology: evolution and concepts. *Eur J Radiol* 78:205-9
11. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y et al (2000). The Vienna classification of

gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 47:251-55

12. Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH et al (2000). Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. *N Eng J Med* 343:162-8
13. Park SH, Choi EK, Lee SS et al (2007). Polyp measurement reliability, accuracy and discrepancy: optical colonoscopy versus CT colonography with pig colonic specimens. *Radiology* 244:157-64
14. Punwani S, Halligan S, Irving P et al (2008). Measurement of colonic polyps by radiologists and endoscopists: Who is most accurate? *Eur Radiol* 18:874-81
15. Summers RM (2010). Polyp size measurement at CT Colonography: what do we know and what do we need to know? *Radiology* 255:707-20
16. Rockey DC, Paulson E, Niedzwiecki D et al (2005). Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison. *Lancet* 365:305-11
17. Rockey DC (2008). Accuracy of CT Colonography for colorectal cancer screening. *N Eng J Med* 359:2842
18. Smith RD, Chandra R, Tangcharoensathien V (2009). Trade and telehealth 4. Trade in health-related services. *Lancet* 373:593-601
19. Kim DH, Yee J (2010). Bridging the gap: using CT Colonography to improve colorectal cancer screening compliance. *Am J Roentgenol* 195(5):1107-9
20. Obstfelder O, Engeset KH, Wynn R (2007). Characteristics of successfully implemented telemedical applications. *Implementation Science* 2:25
21. Graser A, Stieber P, Nagel D et al (2009). Comparison of CT Colonography, colonoscopy, sigmoidoscopy and faecal occult blood tests for the detection of advanced adenoma in an average risk population. *Gut* 58:241-8
22. Regge D, Laudi C, Galatola G et al (2009). Diagnostic accuracy of computed tomographic colonography for the detection of advanced neoplasia in individuals at increased risk of colorectal cancer. *JAMA* 301:2453-61
23. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF et al (2009). Association of colonoscopy and

- death from colorectal cancer. *Ann Intern Med* 150:1-8
24. Inadomi J (2010). Interval cancers after colonoscopy: the importance of training. *Am J Gastroenterol* 105:2597-98
 25. Brenner H, Hoffmeister M, Arndt V et al (2010). Protection from right- and left-sided colorectal neoplasms after colonoscopy: population-based study. *J Natl Cancer Inst* 102:89-95
 26. Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M (2011). Protection from colorectal cancer after colonoscopy. *Ann Intern Med* 154:22-30
 27. Hewett DG, Rex DK (2011). Miss rate of right-sided colon examination during colonoscopy defined by retroflexion: an observational study. *Gastrointest Endosc* 74:246-52
 28. Laiyemo AO, Doubeni C, Sanderson AK 2nd et al (2011). Likelihood of missed and recurrent adenomas in the proximal versus the distal colon. *Gastrointest Endosc* 74:253-61
 29. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R (2011). Colorectal cancer: CT Colonography and colonoscopy for detection – Systematic review and meta-analysis. *Radiology* 259:393-405
 30. Doshi T, Rusinak D, Halvorsen RA et al (2007). CT Colonography: false-negative interpretations. *Radiology* 244:165-73
 31. Flicek KT, Hara AK, Silva AC, Wu Q, Peter MB, Johnson CD (2010). Reducing the radiation dose for CT Colonography using adaptive statistical iterative reconstruction: a pilot study. *Am J Roentgenol* 195(1):126-31
 32. Sosna J, Blachar A, Amitai M, Barmeir E, Peled N, Goldberg SN, Bar-Ziv J (2006). Colonic perforation at CT Colonography: assessment of risk in a multicenter large cohort. *Radiology* 239(2):457-63
 33. Burling D, Halligan S, Slater A, Noakes MJ, Taylor SA (2006). Potentially serious adverse events at CT Colonography in symptomatic patients: national survey of The United Kingdom. *Radiology* 239(2):464-71
 34. Pickhardt P (2006). Incidence of colonic perforation at CT Colonography: review of

- existing data and implications for screening of asymptomatic adults. *Radiology* 239(2):313-6
35. Heresbach D, Djabbari M, Riou F et al (2011). Accuracy of computed tomographic colonography in a nationwide multicenter trial, and its relation to radiologist expertise. *Gut* 60(5):658-65
 36. Hixson LJ, Fennerty MB, Sampliner RE, Garewal HS (1991). Prospective blinded trial of the colonoscopic miss-rate of large colorectal polyps. *Gastrointest Endosc* 37(2):125-7
 37. Rex DK, Cutler CS, Lemmel GT, Rahmani EY, Clark DW, Helper DJ, Lehman GA, Mark DG (1997). Colonoscopic miss rates of adenomas determined by back-to-back colonoscopies. *Gastroenterology* 112(1):24-8
 38. Heresbach D, Barrioz T, Lapalus MG, Coumaros D et al (2008). Miss rate for colorectal neoplastic polyps: a prospective multicenter study of back-to-back video colonoscopies. *Endoscopy* 40(4):284-90
 39. Lefere PA, Gryspeerdt SS, Dewyspelaere J et al (2002). Dietary faecal tagging as a cleansing method before CT Colonography: initial results polyp detection and patient acceptance. *Radiology* 224:393-403
 40. Zar, Jerrold H (1996). Biostatistical Analysis. *Prentice Hall International Editions*
 41. Sokal R, Rohlf F (1995). Biometry. *W. H. Freeman and Company*
 42. Lachin J (2000). Biostatistical methods. *John Wiley & Sons*
 43. Ahmed M, Raval P, Buganza G (1996). Oral sodium phosphate catharsis and acute renal failure. *Am J Gastroenterol* 91:1261-2
 44. Adverse Drug Reactions Advisory Committee (ADRAC) (1997). Electrolyte disturbances with oral phosphate bowel preparations. *Australian Adverse Drug Reactions. Bulletin* 16(1)
 45. Boivin MA, Kahn SR (1998). Symptomatic hypocalcemia from oral sodium phosphate: a report of two cases. *Am Gastroenterol* 93:2577-9
 46. Orias M, Mahnensmith RL, Perazella MA (1999). Extreme hyperphosphatemia and an

- acute renal failure after phosphorus-containing bowel regimen. *Am J Nephrol* 19:60-3
47. Vukasin P, Weston LA, Beart RW (1997). Oral Fleet Phosphosoda Laxative induced hyperphosphatemia and hypocalcemic tetany in an adult. *Dis Colon Rectum* 40:497-9
 48. Clarkston WK, Tsen TN, Dies DF, Schratz L, Vaswani SK, Bjerregaard P (1996). Oral sodium phosphate versus sulphate-free polyethylene glycol electrolyte lavage solution in outpatient preparation for colonoscopy: a prospective comparison. *Gastrointest Endosc* 43:42-8
 49. DiPalma JA, Buckley SE, Warner BA, Culpepper RM (1996). Biochemical effects of oral sodium phosphate. *Dig Dis Sci* 41:749-53
 50. Huynh T, Vanner S, Paterson W (1995). Safety profile of 5-h oral sodium phosphate regimen for colonoscopy cleansing: lack of clinically significant hypocalcemia or hypovolemia. *Am J Gastroenterol* 90:104-7
 51. Lieberman DA, Ghormley J, Flora K (1996). Effect of oral sodium phosphate colon preparation on serum electrolytes in patients with normal serum creatinine. *Gastrointest Endoscopy* 43:467-69
 52. Vanner SJ, MacDonald PH, Paterson WG, Prentice RSA, DaCosta LR, Beck IT (1990). A randomized prospective trial comparing oral sodium phosphate with standard polyethylene glycol-based lavage solution (GoLYTELY®) in the preparation of patients for colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 85:422-27
 53. Campisi P, Badhwar V, Morin S, Trudel JL (1999). Postoperative hypocalcemic tetany caused by Fleet Phosphosoda preparation in a patient taking alendronate sodium. *Dis Colon Rectum* 42:1499-1501
 54. Chan A, Depew WT, Vanner SJ (2002). Use oral sodium phosphate colonic lavage solution by Canadian colonoscopists: pitfalls and complications. *Can J Gastroenterol* 11:334-8
 55. Barclay RL, Depew WT, Vanner SJ (2002). Carbohydrate-electrolyte rehydration protects against intravascular volume contraction during colonic cleansing with orally administered sodium phosphate. *Gastrointest Endosc* 56(5):633-38
 56. Desmeules et al (2003). Acute phosphate nephropathy and renal failure. *N Eng J Med*

349(10):1006-7

57. Gumurdulu et al (2004). Age as a predictor of hyperphosphatemia after oral Phosphosoda administration for colon preparation. *J Gastroent and Hepatol* 19:68-72
58. Markowitz et al (2005). Acute phosphate nephropathy following oral sodium phosphate bowel purgative: an under-recognized cause of chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16(11):3389-96
59. Perazella MA (2005). Drug-induced nephropathy: an update. *Expert Opin. Drug Saf* 4(4):689-706
60. Tjandra JJ, Tagkalidis P (2004). Carbohydrate- electrolyte (E-lyte) solution enhances bowel preparation with oral Fleet Phosphosoda. *Dis Colon Rectum* 47(7):1181-86
61. Neri E, Halligan S, Hellstrom M et al (2013). The second ESGAR consensus statement on CT Colonography. *Eur Radiol* Sep 15 [Epub ahead of print]
62. Macari M et al (2004). Colorectal polyps and cancers in asymptomatic average-risk patients: evaluation with CT colonography. *Radiology* 230(3): 629-36. Epub 2004 Jan 22
63. Cornett D et al (2008). Findings on optical colonoscopy after positive CT colonography exam. *Am J Gastroenterol* 103(8): 2068-74. doi: 10.1111/j. 1572-0241. 2008. 01919.x. Epub 2008 Jun 28
64. Margriet C de Haan et al (2011). Diagnostic value of CT colonographyas compared to colonoscopy in an asymptomatic screening population: a meta-analysis. *Eur Radiol* 21(8): 1747-63
65. Halligan S et al (2007). Design of a multicentre randomized trial to evaluate CT colonography versus colonoscopy or barium enema for diagnosis of colonic cancer in older symptomatic patients: the SIGGAR study. *Trials* 27 ; 8:32
66. von Wagner C et al (2011). Patient acceptability of CT colonography compared with double contrast barium enema: results from a multicentre randomized controlled trial of symptomatic patients. *Eur Radiol* 21 (10): 2046-55. do: 10.1007/s0033-011-2154-y. Epub 2011 May 31
67. Macari M et al (2004). Significance of missed polyps at CT Colonography. *Am J Roentgenol* 183 (1): 127-34

7.3 Satisfação com os exames de colonoscopia

1. Aalto AM, Heijmans M, Weinman J, Aro AR (2005). Illness perceptions in coronary heart disease: sociodemographic, illness-related and psychosocial correlates. *Journal of Psychosomatic Research*. 58 (5):393-402
2. Aalto AM, Aro AR, Weinman J, Heijmans M, Manderbacka K, Elovainio M (2006). Sociodemographic, disease status, and illness perceptions predictors of global self-ratings of health and quality of life among those with coronary heart disease-one year follow-up study. *Quality of life research: an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation* 15(8): 1307-22. DOI:10.1007/s11136-006-0010-3
3. Attitudes P, Toward S (2001). Satisfação do utente e atitudes face aos médicos e medicina: um estudo piloto 1. 2 (2):69-80
4. Azjen I (1985). From intentions to actions: a theory of planned behavior. In: Kuhl J. Beckmann J (Eds). *Action control: from cognition to behavior* (pp 11-39). Springer: Heidelberg
5. Becker MH (1974). The Health Belief Model and personal health behavior. *Health Education Monographs* 2:376-423
6. Binek J, Sagmeister M, Borovicka J, Knierim M, Magdeburg B, Meyenberger C (2003). Perception of gastrointestinal endoscopy by patients and examiners with and without background music. *Digestion* 68(1):5-8. DOI:10.1159/000073219
7. Bitner MJ(1990) . Evaluating service encounters: The effects of physical surroundings and employee responses. *Journal of Marketing* 54:69 - 82
8. Dunham DP, Butter J, Liss D, Wayne D, Green M, Baker D(2009). Patient and Physician Perceptions of Examination Room versus Traditional Presentations in a Resident. *Medicine Clinic* 1(1):1-7
9. Fennessy MM et al (2012). Gender differences in illness perceptions for patients with stable coronary disease. Conference in Virgínia Henderson International Nursing Library (não publicado). retirado de <http://www.nursinglibrary.org/vhl/handle/10755/211580>. em 25 de Maio de 2012
10. Festinger L (1975). *Teoria da Dissonância Cognitiva*. Rio de Janeiro: Zahar.

11. Jeffcott M, Johnson C (1996). An Examination of Risk Manager's Perceptions of Medical Incidents Michele Jeffcott and Chris Johnson. Dept. of Computing Science. University of Glasgow. Glasgow. G12 9QQ. Scotland. <http://www.dcs.gla.ac.uk/~shellyj/~johnson>
12. Maroco J, Garcia-Marques T (2006). Qual a fiabilidade do alfa de Cronbach? Questões antigas e soluções modernas? *Laboratório de Psicologia* 4(1): 65-90.
13. Mitkovic M et al (2010). Illness perception in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicinski Pregled* 63(3-4):179-82
14. Oliver RL (1997). Satisfaction: a behavioral perspective on the consumer. New York. McGraw-Hill.
15. Parsa P, Kandiah M (2005). Breast cancer knowledge. perception and breast self-examination practices among Iranian women. 4(2):17-24.
16. Read SJ, Snow CJ, Simon D (2003). Constraint Satisfaction Processes in Social Reasoning. In *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Cognitive Science Society*:964-969.
17. Rees G, Fry A, Cull A, Sutton S (2004). Illness perceptions and distress in women at increased risk of breast cancer. *Psychology & Health* 19(6):749-765. DOI:10.1080/08870440412331279764
18. Ross S, Walker A, MacLeod MJ (2004). Patient compliance in hypertension: role of illness perceptions and treatment beliefs. *Journal of Human Hypertension* 18:607-13.
19. Takemura Y, Liu J, Atsumi R, Tsuda T (2006). Development of a questionnaire to evaluate patient satisfaction with medical encounters. *The Tohoku journal of experimental medicine* 210(4). 373-81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146204>
20. Weiner B (1985). "Spontaneous" causal thinking. *Psychological Bulletin* 97 (1):74-84.
21. Witteman C, Bolks L, Hutschemaekers G (2011). Development of the Illness Perception Questionnaire Mental Health. *Journal of mental health (Abingdon. England)* 20(2):115-25. DOI:10.3109/09638237.2010.507685
22. Weaver D, Brickman P (1974). Expectancy, feedback and disconfirmation as independent factors in outcome satisfaction. *Journal of Personality and Social Psychology*, Vol 30(3),

420-428. doi: 10.1037/h0036854

23. Walster GW, Berscheid E (1978). Equity: Theory and research. Boston: Allyn and Bacon
24. Berkowitz L (Ed), Walster E (Ed) (1976). Equity Theory: Toward a General Theory of Social Interaction. San Diego: Academic Press
25. Takemura Y, Liu J, Atsumi R, Tsuda T (2006) Development of a Questionnaire to evaluate patient satisfaction with medical encounters. *Tohoku J. Exp. Med.* 210:373-81

7.4 Significado epidemiológico e importância em Saúde Pública dos Programas de Rastreio

1. Hutchinson GB (1960). Evaluation of preventive services. *J Chronic Dis* 11:497-508
2. Last JM (2000). A Dictionary of Epidemiology (4th ed). New York, Oxford University Press
3. Gordis L (2009). Epidemiology (4th ed). Saunders and Elsevier. New York, USA
4. Rose G (1985). Sick individuals and sick populations. *Int J Epidemiol* 14:32-38
5. Cohen J (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 20:37
6. Landis JR, Koch GG (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159
7. MacLure M, Willett WC (1987). Misinterpretation and misuse of the kappa statistic. *Am J Epidemiol* 126:161
8. Fleiss JL (1981). Statistical methods for rates and proportions (2nd ed). New York, John Wiley & Sons (Ed)

7.5 Aplicabilidade da análise molecular do DNA fecal para rastreamento da patologia colorretal esporádica

1. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1993) Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Eng J Med* 329: 1982-87
2. Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 10:789-99
3. Hartwell LH, Kastan MB (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 16; 266(5192):1821-28
4. Markowitz S (2000). DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol* 18(21 suppl):75S-80S
5. Sherr CJ (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 23; 116(2):235-46
6. Zhivotovsky B, Kroemer G (2004). Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9):752-62
7. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ (1998). The murine gene p27 Kip1 is haplo-insufficient for tumor suppression. *Nature* 12; 396 (6707):177-80
8. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Wilson JK, Hamilton S, Vogelstein B (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50(23):7717-22
9. Croce C (2008). Oncogenes and cancer. *N Eng J Med* 358:502-11
10. Melo JV (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88(7):2375-84
11. Pelicci PG, Knowles DM, Magrath I, Dalla-Favera R (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt Lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(9):2984-8
12. Armitage P, Doll R (1954). The age distribution of cancer and a multistage theory of

carcinogenesis. *Br J Cancer* 8:1-12

13. Moolgavkar SH, Luebeck EG (1992). Multistage carcinogenesis: a population- based model for colon cancer. *JNCI* 84: 610-18
14. Little MP (2010). Cancer models. genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biol Direct* 5:19
15. Knudson AG (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-23
16. Little MP (1995). Are two mutations sufficient to cause cancer? Some generalizations of the two-mutation model of carcinogenesis of Moolgavkar, Venzon and Knudson. and of the multistage model of Armitage and Doll. *Biometrics* 51:1278-91
17. Moolgavkar SH, Venzon DJ (1979). Two-event models for carcinogenesis: incidence curves for childhood and adult tumors. *Mathematical Biosciences* 47:55-77
18. Little MP, Wright EG (2003). A stochastic carcinogenesis model incorporating genomic instability fitted to colon cancer data. *Math Biosci* 183 (2): 111-134
19. Moolgavkar SH, Dewanji A, Venzon DJ (1988). A stochastic two-stage model for cancer risk assessment. I. The hazard function and the probability of tumor. *Risk Analysis* 8(3):383-92
20. Day DW, Jass JR, Price AB (2003). Epithelial tumors of the large intestine. Blackwell Publishing Oxford
21. Smith RA et al. (2006). American Cancer Society: guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 56 (1):11-25.
22. Ferlay J et al. 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18 (3):581-592
23. From the Centers for Disease Control and Prevention (2003). Colorectal cancer test use among persons aged ≥ 50 years in USA in 2001. *Jama* 289(19):2492-3
24. Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*

61:759-67

25. Chung DC (2000). The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 119(3):854-65
26. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ (2002). The colorectal adenoma- carcinoma sequence. *Br J Surg.* 89(7):845-60
27. Traverso G et al. (2002). Detection of APC mutations in faecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346 (5):311-320.
28. Syngal S et al. (2002). Stool DNA analysis for the detection and follow-up of colorectal (CRC) and advanced adenomas (AA): sensitivity in a prospective series. *Am J Gastroenterol* 97 (S109).
29. Abbaszadegan MR et al. (2007). Stool-based DNA testing. a new noninvasive method for colorectal cancer screening. the first report from Iran. *World J Gastroenterol* 13 (10):1528-33.
30. Ahlquist T, Lind GE, Costa VL, Meling GI, Vatn M, Hoff GS, Roguun TO, Skotheim RI, Thiis-Evensen E, Lothe RA (2008). Gene methylation profiles of normal mucosa and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol Cancer* 7:94
31. Zou H, Harrington JJ, Klatt KK, Ahlquist DA (2006). A sensitive method to quantify human long DNA in stool: relevance to colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1115-1119
32. Wan J et al. (2004). Detection of K-ras gene mutation in faecal samples from elderly large intestinal cancer patients and its diagnostic significance. *World J Gastroenterol* 10 (5):743-746.
33. Klaassen CH et al. (2003). Quantification of human DNA in faeces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer. *Clin Chem* 49 (7):1185-1187.
34. Fodde R (2002). The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 38 (7):867-871.
35. Albuquerque C, Brenkel C, van der Luijt R, Fidalgo P, Lage P, Slors FJ, Leitão CN,

- Fodde R, Smits R (2002). The “just-right” signalling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Hum Mol Genet* 11(13):1549-60
36. Polakis P (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17(1):45-51
37. Aoki K, Taketo MM (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multifunctional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* 120(Pt 19):3327-35
38. Goss KH, Groden J (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 18(9):1967-79
39. Schneikert J, Behrens J (2006). Truncated APC is required for cell proliferation and DNA replication. *Int J Cancer* 119(1):74-9
40. Gilbert SF (2003). Developmental Biology. 7th edition. Sunderland. Massachusetts: Sinauer and Associates
41. Bright-Thomas RM, Hargest R (2003). APC, beta-catenin and hTCF-4: an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 29(2):107-17
42. van Es JH, Giles RH, Clevers HC (2001). The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res* 264(1):126-34
43. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10(7):721-33
44. Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* 55(14):2972-7
45. Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Baeg GH, Kawahara T, Kobayashi S, Okada M, Toyoshima K, Akiyama T (1996). Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Science* 272(5264):1020-3
46. Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87(2):159-70

47. Cetta F, Curia MC, Montalto G, Gori M, Cama A, Battista P, Barbarisi A (2001). Thyroid carcinoma usually occurs in patients with familial adenomatous polyposis in the absence of biallelic inactivation of the adenomatous polyposis coli gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86:427-32
48. Segditsas S, Tomlinson I (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25(57):7531-7
49. Schneikert J, Grohmann A, Behrens J (2007b). Truncated APC regulates the transcriptional activity of beta-catenin in a cell cycle dependent manner. *Hum Mol Genet* 16(2):199-209
50. Gideon P, John J, Frech M, Lautwein A, Clark R, Scheffler JE, Wittinghofer A(1992). Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* 12(5):2050-6
51. Peyssonnaud C, Eychene A (2001). The Raf/Merk/Erk pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93(1-2):53-62
52. Santini D et al. (2008). High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 13 (12):1270-1275.
53. Sparmann A, Bar-Sagi D (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6(5):447-58
54. Kalady MF, DeJulius KL, Sanchez JA, Jarrar A, Liu X, Manilich E, Skacel M, Church JM (2012). BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum* 55(2):128-33
55. Jancik S, Drabek J, Radzioch D, Hajdich M (2010). Clinical relevance of K-ras in human cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010:150960
56. Hancock JF, Prior IA (2005). Electron microscopic imaging of Ras signaling domains. *Methods* 37(2):165-72
57. Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA, Tromick SR, Aaronson SA, Swan DC

- (1985). Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somat Cell Mol Genet* 11(2):149-55
58. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A (1997). The Ras-RasGap complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277(5324):333-8
 59. Ross PJ, George M, Cunningham D, DiStefano F, Andreyev HJ, Workman P, Clarke PA (2001). Inhibition of Kirsten-ras expression in human colorectal cancer using rationally select Kirsten-ras antisense oligonucleótidos. *Mol Cancer Ther* 1(1):29-41
 60. Ikeda N, Nakajima Y, Sho M, Adachi M, Huang CL, Iki K, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M (2001). The association of k-ras gene mutation and vascular endothelial growth factor gene expression in pancreatic carcinoma. *Cancer* 92(3):488-99
 61. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, Digilio C, Palleschi A, Pizzuti A, Grammatico P, Zampino G, Dallapiccola B, Gelb BD, Tartaglia M (2006). Germline missense mutations affecting K-Ras Isoform B are associated with severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 79(1):129-35
 62. Schubbert S, Shannon K, Bollag G (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7(4):295-308
 63. Gremer L, Merbitz-Zahradnik T, Dvorsky R, Cirstea IC, Kratz CP, Zenker M, Wittinghofer A, Ahmadian MR (2011). Germline K-ras mutations cause aberrant biochemical and physical properties leading to developmental disorders. *Hum Mutat* 32(1):33-43
 64. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillissen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Willson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y (2006). Germline K-ras and B-raf mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38(3):294-6
 65. Hirai H, Okabe T, Anraku Y, Fujisawa M, Urabe A, Takaku F (1985). Activation of the c-k-ras oncogene in a human pancreas carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 127(1):168-74

66. Lee JW, Yoo NJ, Soung YH, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Ko YH, Kim SH, Nam SW, Lee JY, Lee SH (2003). BRAF mutations in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 89(1):1958-60
67. Sharma MK, Zehnbaauer BA, Watson MA, Gutmann DH (2005a). Ras pathway activation and an oncogenic Ras mutation in sporadic pilocytic astrocitoma. *Neurology* 65(8):1335-6
68. Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, Lam WK, Chin SW, Girard L, Minna JD, Gazdar AF, Wong MP (2006). Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 12(5):1647-53
69. Downward J (2003). Role of receptor tyrosinekinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? *Biochem J* 376 (Pt 3):e9-10
70. Kranenburg O (2005). The KRAS oncogene: past. present and future. *Biochi Biophys Acta* 1756(2):81-2
71. Velho S et al. (2008). BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer* 8:255. 255.
72. Syngal S, Bandipalliam P, Boland CR (2005). Surveillance of patients at high risk for colorectal cancer. *Med Clin North Am* 89(1):61-84
73. Jin YM, Li BJ, Qu B, Du YJ (2006). BRAF, KRAS and BAT 26 mutations in colorectal polyps and stool. *World J Gastroenterol* 12(32):5148-52
74. Smith G et al. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci US* 99 (14):9433-9438.
75. Jeon CH et al. (2008). Genetic alterations of APC, K-ras, p53, MSI, and MAGE in Korean colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 23 (1):29-35.
76. Frattini M et al. (2004). Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10 (12 Pt 1):4015-4021

77. Calistri D et al. (2005). Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol* 204 (2):484-488.
78. Berg M, Danielsen S, Ahlquist T, Merok M, Agesen TH, Vatn MH, Mala T, Sjo OH, Bakka A, Moberg I, Fetveit T, Mathisen O, Husby A, Sandvik O, Nesbakken A, Thiis-Evensen E, Lothe Ra (2010). DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-p53 related to age at disease onset. *PLoS One* 5(11):e13978
79. Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, Hibi K, Goodman SN, D'Alessio M, Paty P, Hamilton SR, Sidransky D, Barany F, Levin B, Shuber A, Kinzler KW, Vogelstein B, Jen J (2001). Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 93 (11):858-865.
80. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalcal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, AU HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR (2008). K-ras mutations and benefit from Cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Eng J Med* 359(17):1757-65
81. Ahlquist T et al. (2008). Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol Cancer* 7:94
82. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 319(9):525-32
83. Pretlow TP (1995). Aberrant crypt foci and K-ras mutations: earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis? *Gastroenterology* 108 (2):600-603.
84. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2008). KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *J Clin Oncol* 26(3):374-9
85. Uberall I, Kolar Z, Trojanec R, Berkovcova J, Hajduch M (2008). The status and role of Erb B receptors in human cancer. *Exp Mol Pathol* 84(2):79-89

86. Herbst RS, Shin DM (2002). Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 94 (5):1593-1611.
87. Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germa JR, Herman JG, Capella G, Peinado MA (2001). K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 19(2):299-304
88. Amado RG, Wolf M, Peeters M, van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorsky R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008). Wild-type KRAS is required for Panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(10):1626-34
89. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A (2009). Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 35(3):262-71
90. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP (2005b). Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* 65(6):2412-21
91. Bottos A, Martini M, Di Nicolantonio F, Comunanza V, Maione F, Minassi A, Appendino G, Bussolino F, Bardelli A (2012). Targeting oncogenic serine/threonine-protein kinase BRAF in cancer cells inhibits angiogenesis and abrogates hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(6):E353-9
92. Zerilli M, Zito G, Martorana A, Pitrone M, Cabibi D, Cappello F et al (2010). BRAF (V600E) mutation influences hypoxia-inducible factor-1 α expression levels in papillary thyroid cancer. *Mol Pathol* 23: 1052-1060
93. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418(6901):934
94. Sjoblom T, Jones S, Wood L, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Lin C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE 82006).

- The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314(5797):268-74
95. Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M (2002). Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 62(23):7001-3
 96. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y (2006). The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 203(7):1651-6
 97. Dankort D et al. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* 21 (4):379-384.
 98. O'Brien MJ et al. (2006). Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 30 (12):1491-1501
 99. Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES, Hazra A, Hunter DJ, Quackenbush J, Spiegelman D, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S (2008). Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS One* 3(11):e3698
 100. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzuchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A (2008). Wild-type BRAF is required for response to Panitumumab or Cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(35):5705-12
 101. Loupakakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F (2009). KRAS codon 61, and BRAF mutations predict resistance to Cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101(4):715-21
 102. Bardelli A, Siena S (2010). Molecular mechanisms of resistance to Cetuximab and Panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 28(7):1254-61

103. Jin S, Levine AJ (2001). The p53 functional circuit. *J Cell Sci* 114(Pt 23):4139-40
104. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A (2010). LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 392(3):252-7
105. Haupt Y, Maya R, Kazar A, Oren M (1997). MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387(6630):296-9
106. Sengupta S, Harris CC (2005). P53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):44-55
107. McDermott U, Longley DB, Johnston PG (2002). Molecular and biochemical markers in colorectal cancer. *Ann Oncol* 13 Suppl 4:235-45
108. Jiang DK, Yao L, Ren WH, Wang WZ, Peng B, Yu L (2011). TP53 Arg72Pro polymorphism and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Med Oncol* 28(4):1129-35
109. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63(20):6643-50
110. Petitjean A, Mathe A, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28(6):622-9
111. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(1):a001008
112. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Futreal PA, Stratton MR, Wooster R (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 91(2):355-8
113. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, Futreal PA (2011). COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in

- Cancer. *Nucleic Acids Res* 39 (Database issue):D945-50
114. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5):402-12
 115. Smeenk L, van Heeringen SJ, Koeppel M, van Driel MA, Bartels SJ, Akkers RC, Denisson S, Stunnenberg HG, Lohrum M (2008). Characterization of genome- wild p53-binding sites upon stress response. *Nucleic Acids Res* 36(11):3639-54
 116. Soussi T, Beroud C (2001). Assessing TP53 status in human tumors to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1(3):233-40
 117. Goldstein I, Marcel V, Olivier M, Oren M, Rotter V, Hainaut P (2011). Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Ther* 18(1):2-11
 118. Diep CB et al. (2003). Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 21 (5):820-829
 119. Syngal S, Stoffel E, Chung D, Willett C, Schoetz D, Schroy P, Jagadeesh D, Morel K, Ross M (2006). Detection of stool DNA mutations before and after treatment of colorectal neoplasia. *Cancer* 106(2):277-83
 120. Iacopetta B, Russo A, Bazan V et al (2006). Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Group. *Ann Oncol* 17(5):842-7
 121. Kerr JF et al. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (4):239-257
 122. Boynton KA, Summerhayes IC, Ahlquist DA, Shuber AP (2003). DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Clin Chem* 49(7):1058-65
 123. Ahlquist DA et al. (2000). Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 119 (5):1219-1227

124. Zhang J, Yang S, Xie Y, Chen X, Zhao Y, He D et al (2012). Detection of methylated tissue factor pathway inhibitor 2 and human long DNA in fecal samples of patients with colorectal cancer in China. *Cancer Epidemiol* 36: 73-77
125. Ast G (2004). How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5(10):773-82
126. Imperiale TF et al. (2004). Faecal DNA versus faecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 351 (26):2704-2714
127. Tagore KS et al. (2003). Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 3 (1):47-53
128. Anderson S et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (5806):457-465
129. Andrews RM et al. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23 (2):147
130. Bianchi NO et al. (2001). Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res* 488 (1):9-23
131. Carew JS, Huang P (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 1:9. 9
132. Polyak K et al. (1998). Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 20 (3):291-293
133. Habano W et al. (1998). Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 17 (15):1931-1937
134. Habano W et al. (1999). Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability. *Int J Cancer* 83 (5):625-629
135. Legras A et al. (2008). Mitochondrial D310 mutations in colorectal adenomas: an early but not causative genetic event during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 122 (10):2242-2248

136. Abbaszadegan MR et al. (2005). Aberrant p16 methylation. a possible epigenetic risk factor in familial oesophageal squamous cell carcinoma. *Int J Gastrointest Cancer* 36 (1):47-54
137. Toyota M et al. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci US* 96(15):8681-8686
138. Chen WD et al. (2005). Detection in faecal DNA of colon cancer-specific methylation of the non expressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst* 97 (15):1124-1132
139. Zou H, Harrington JJ, Shire AM, Rego RL, Wang L, Campbell ME et al (2007). Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 2686-2696
140. Winawer SJ, Zauber AG (2002). The advanced adenoma as the primary target of screening. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, vol 12, pp 1-9
- 140a. The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery (2007). Springer Science
- 140b Iino H, Jass JR, Simms LA et al. (1999). Dna microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol* 52:5-9
- 140c Regula J, Rupinski M, Kraszewska E et al. (2006). Colonoscopy in Colorectal- Cancer Screening for Detection of Advanced Neoplasia. *N Engl J Med* 355: 1863-72
141. Morson BC & Dawson IMP (1990) Gastrointestinal Pathology. Blackwell Scientific Publications
142. Beroud C, Verdier F, Soussi T (1996). P53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res* 24(1):147-50
143. Devouassoux-Shisheboran M et al. (2001). Expression of hMLH1 and hMSH2 and assessment of microsatellite instability in testicular and mediastinal germ cell tumours. *Mol Hum Reprod* 7 (12):1099-1105
144. Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP (2000). APC mutations in sporadic colorectal tumors: a

- mutational “hotspot” and interdependence of the “two hits”. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(7):3352-7
145. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ (2005). The prognostic significance of K-ras, p53 and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 54(9):1283-6
 146. Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009). Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Eng J Med* 361(25):2449-60
 147. Galiatsatos P, Foulkes WD (2006). Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101(2):385-98
 148. Smits R, Kielman MF, Breukel C, Zurcher C, Neufeld K, Jagmohan-Changur S, Hofland N, van Dijk J, White R, Edelmann W, Kucherlapati R, Khan PM, Fodde R (1999). Apc 1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 13(10):1309-21
 149. Cheadle JP, Krawczac M, Thomas MW, Hodges AK, Al-Tassan, Fleming N, Sampson JR (2002). Different combinations of biallelic APC mutation confer different growth advantages in colorectal tumors. *Cancer Res* 62(2):363-6
 150. Dihlmann S, Gebert J, Siermann A, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M (1999). Dominant negative effect of the APC 1309 mutation: a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 59(8):1857-60
 151. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(7):3046-50
 152. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P (1997). Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* 57(20):4624-30
 153. Su LK, Steinbach G, Sawyer JC, Hindi M, Ward PA, Lynch PM (2000). Genomic rearrangements of the APC tumor-suppressor gene in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 106(1):101-7

154. Henderson BR (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta- catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2:653-60
155. Galea MA, Eleftheriou A, Henderson BR (2001). ARM domain-dependent nuclear import of adenomatous polyposis coli protein is stimulated by the B56 alpha subunit of protein Phosphatase 2A. *J Biol Chem* 276:45833-39
156. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359(6392):235-7
157. Gayther SA, Sud R, Wells D, Tsioupra K, Delhanty JD (1995). Rapid detection of rare variants and common polymorphisms in the APC gene by PCR-SSCP for presymptomatic diagnosis and showing allele loss. *J Med Genet* 32(7):568-71
158. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Maroi T, Nakamura Y (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1:229-33
159. Chen SP, Tsai ST, Jao SW, Huang YL, Chao YC, Chen YL, Wu CC, Lin SZ, Harn HJ (2006). Single nucleotide polymorphisms of the APC gene and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. *BMC Cancer* 6:83
160. Vogelstein B, Kinzler KW (1998). The genetic basis of human cancer. McGraw- Hill. New York
161. Davies H et al (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892):949-54
162. Jass JR (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50(1):113-30
163. Minoo P, Moyer MP, Jass JR (2007). Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumorigenesis. *J Pathol* 212(2):124-33
164. Hawkins NJ, Ward RL (2001). Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst* 93(17):1307-13

165. Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ (2004). BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol* 28:1452-1459
166. Garnett MJ, Marais R (2004). Guilty as charged: B-raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 6(4):313-9
167. Jancik S, Drabek J, Radzioch D, Hajduch M (2010). Clinical relevance of K-ras in human cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010:150960
168. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL (2009). American Society of Clinical Oncology (ASCO) provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-EGFR monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 27(12):2091-6
169. Robert V, Michel P, Flaman JM, Chiron A, Martin C, Charbonnier F, Paillot B, Frebourg T (2000). High frequency in esophageal cancers of p53 alterations inactivating the regulations of genes involved in cell cycle and apoptosis. *Carcinogenesis* 21(4):563-5
170. Sakuragi N, Watari H, Ebina Y, Yamamoto R, Steiner E, Koelbl H, Yano M, Tada M, Morinchi T (2005). Functional Analysis of p53 gene and the prognostic impact of dominant-negative p53 mutation in endometrial cancer. *Int J Cancer* 116(4):514-9
171. Mahdavinia M, Bishehsari F, Verginelli F, Cumashi A, Lattanzio R, Sotoudeh M, Ansari R, Semeraro D, Hormazdi M, Fakheri H, Rakhshani N, De Lellis L, Curia MC, Cama A, Piantelli M, Malekzadeh R, Iacobelli S, Mariani-Constantini R (2008). P53 mutations in colorectal cancer from northern Iran: relationships
172. Jernvall P, Makinen M, Karttunen T, Makela J, Vihko P (1997). Conserved region mutations of the p53 gene are concentrated in distal colorectal cancers. *Int J Cancer* 74(1):97-101
173. Iacopetta B (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 21(3):271-6
174. Kat Koori VR, Jia X, Shanmugam C, Wan W, Meleth S, Bumpers H, Grizzle WE.

- Manne U (2009). Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism differs with race in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 15(7):2406-16
175. Bykov VJ. Issaeva N. Zache N. Shilov A. Hultcrantz M. Bergman J. Selivanova G. Wiman KG (2005). Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J Biol Chem* 280(34):30384-91
176. Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE et al (1996). Specific *P53* mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 2: 811-814
177. Brosh R. Rotter V (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9(10):701-13
178. Franklin WA. Gazdar AF. Haney J. Wistuba II. La Rosa FG. Kennedy T. Ritchey DM. Miller YE (1997). Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J Clin Invest* 100(8):2133-7
179. Tullo A. D'Erchia AM. Honda K. Mitry RR. Kelly MD. Habib NA. Saccone C. Sbisa E (1999). Characterization of p53 mutations in colorectal liver metastasis and correlation with clinical parameters. *Clin Cancer Res* 5(11):3523-8
180. Olivier M. Petitjean A. Marcel V. Petre A. Monnawar M. Plymoth A. de Fromentel CC. Hainaut P (2009). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 16(1):1-12
181. Naccarati A. Polakova V. Pardini B. Vodickova L. Hemminki K. Kumar R. Vodicka P (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene – an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis* 27(2):211-8
182. Kreader CA (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 62(3):1102-6
183. Schneider-Stock R. Boltze C. Peters B. Szibor R. Landt O. Meyer F. Roessner A (2004). Selective loss of codon 72proline p53 and frequent mutational inactivation of the retained arginine allele in colorectal cancer. *Neoplasia* 6(5):529-35
184. McMurray HR. Sampson ER. Compitello G. Kinsey C. Newman L. Smith B. Chen

- SR. Klebanov L. Salzman P. Yakovlev A. Land H (2008). Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. *Nature* 453(7198):1112-6
185. Chiang JM. Wu Chou YH. Ma SC. Chen JR (2004). Influence of age on adenomatous polyposis coli and p53 mutation frequency in sporadic colorectal cancer – rarity of co-occurrence of mutations in APC. K-ras and p53 genes. *Virchows Arch* 445(5):465-71
 186. Luchtenberg M. Weijenberg MP. Wark PA. Saritas AM. Roemen GM. van Muijen GN. de Bruine AP. van den Brandt PA. de Goeij AF (2005). Mutations in APC. CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* 5:160
 187. Lamlum H. Al Tassan N. Jaeger E. Frayling I. Sieber O. Reza FB. Eckert M. Rowan A. Barclay E. Atkin W. Williams C. Gilbert J. Cheadle J. Bell J. Houlston R. Bodmer W. Sampson J. Tomlinson I (2000a). Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas. with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet* 9(15):2215-21
 188. Lamlum H. Papadopoulou A. Ilyas M. Rowan AJ. Gillet C. Hanby A. Talbot I. Bodmer W. Tomlinson I (2000b). APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(5):2225-8
 189. Groves C. Lamlum H. Crabtree M. Williamson J. Taylor C. Bass S. Cuthbert-Heavens D. Hodgson S. Phillips R. Tomlinson I (2002). Mutation Cluster Region. association between germline and somatic mutations and genotype-phenotype correlation in upper gastrointestinal familial adenomatous polyposis. *Am J Pathol* 160(6):2055-61
 190. Gismondi V. Bonelli L. Sciallero S. Margiocco P. Viel A. Radice P. Mondini P. Sala P. Montera MP. Mareni C. Quaia M. Fornasarig M. Gentile M. Pietro G. Rossini P. Arrigoni A. Meucci GM. Bruzzi P. Varesco L (2002). Prevalence of the E1317Q variant of the APC gene in italian patients with colorectal adenomas. *Genet Test* 6(4):313-7
 191. Fidder HH. Figer A. Zidan J. Bar Meir S. Friedman E (2005). Colonic adenomas do not co-segregate with the I1307K APC missense mutation in an Israeli non-Ashkenazi family. *Dig Dis Sci* 50(1):52-5

192. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM (2011). OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 2.3.1. www.openepi.com
193. Sherry St, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001). dbSNP:the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29(1): 308-11
194. The UniProt Consortium Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt) (2012). *Nucleic Acids Res* 40: D71-D75
195. Lim EH. Zhang SL. Yu K. Nga ME. Ahmed DA. Agasthian T. Wong PS. Chua GC. Wong D. Tan L. Seto KY. Yap WS. Low SP. Khoo KL. Chang A. Ng A (2007). An alternative approach to determining therapeutic choices in advanced non-small cell lung carcinoma (NSCLC): maximizing the diagnostic procedure and the use of low-volume lung biopsies. *J Thorac Oncol* 2(5):387-96
196. van Krieken JH. Jung A. Kirchner T. Carneiro F. Seruca R. Bosman FT. Quirke P. Flejou JF. Plato Hansen T. de Herlog G. Jares P. Langner C. Hoefler G. Lightenberg M. Tiniakos D. Tejpar S. Berilacqua G. Ensari A (2008). KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma – proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 453(5):417-31
197. Andreyev HJ et al (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the “RASCAL II” study. *Br J Cancer* 85(5):692-6

Anexos

1 - FOLHA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO

No mundo ocidental, o carcinoma do cólon e do reto (CCR) está rapidamente a atingir o topo das causas de morte por cancro. Na grande maioria dos casos tem origem numa lesão benigna (pólipo) que alcança a fase de cancro só ao fim de 10 a 15 anos, após várias transformações e mutações genéticas.

Enquanto que uma pequena percentagem do CCR incide em pessoas de alto risco (10 a 20%) com predisposição genética, em mais de 80% dos adultos a lesão ocorre numa forma esporádica e insidiosa, a partir dos 50 anos de idade (pessoas ditas de risco médio).

A introdução dum método de rastreio do CCR, de âmbito nacional, é uma medida importante de Saúde Pública com reflexos sociais e económicos evidentes, tendo em conta que na maioria dos casos é possível detectar lesões pré-cancerosas, totalmente curáveis.

Vários testes de rastreio têm sido analisados: pesquisa de sangue oculto nas fezes, colonoscopia ótica do cólon e reto, clister opaco com papa radiopaca. Nenhum destes testes é ideal, ou porque são dolorosos e podem ter complicações por vezes muito graves, ou porque têm baixa sensibilidade e baixa especificidade para as lesões, ou ainda porque são muito dispendiosos ou consomem muito tempo aos técnicos de saúde que as executam.

Recentemente apareceu uma nova técnica radiológica denominada colonoscopia virtual (CV), totalmente não invasiva e inócua, isto é, sem risco de emissão de radiações em doses perigosas para a saúde.

Por outro lado, o desenvolvimento da biologia molecular permitiu um melhor conhecimento das alterações do ADN (ácido desoxirribonucleico) de muitos tumores, tais como o CCR.

O presente estudo pretende analisar a validade da CV e a importância das alterações do ADN humano nas fezes, como métodos de rastreio ideais, utilizados isoladamente ou em conjunto, no despiste do CCR e das lesões que a ele conduzem, nas populações de risco médio, assintomáticas.

A participação nesta pesquisa é voluntária e não acarreta quaisquer despesas para os indivíduos rastreados para além das deslocações à Clínica de Santa Catarina, local de realização dos exames. Será fornecido, a pedido, certificado de participação no Projeto de Investigação para relevação de faltas ao trabalho.

Metodologicamente, o estudo terá sete etapas:

- Etapa 1 - Delineamento experimental: estudo da dimensão da amostra e da posterior análise estatística.
- Etapa 2 - Utilização dos meios de comunicação social para divulgação do projeto à população e informação e formação dos técnicos de saúde interessados no projeto (centros de saúde, hospitais e elementos de campo);
- Etapa 3 - Admissão de rastreantes em dois tempos: fornecimento individual da FOLHA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO e aplicação do QUESTIONÁRIO DE EXCLUSÃO, sendo o despiste efectuado por pessoal médico devidamente qualificado das áreas da Gastreenterologia e Cirurgia Geral e supervisionado pelo Investigador Principal. Aos rastreados admitidos será fornecido, nesta fase, um folheto de INSTRUÇÕES PARA COLHEITA DE FEZES E SANGUE;
- Etapa 4 - Colheita, armazenamento e envio das amostras de fezes e sangue para o laboratório. Fornecimento das INSTRUÇÕES PARA A PREPARAÇÃO CÓLICA e do material necessário para a preparação;
- Etapa 5 - Após a preparação intestinal, execução sequencial (na mesma manhã ou na mesma tarde) e pela ordem indicada, dos dois exames e do questionário:

Colonoscopia virtual (CV)

Colonoscopia ótica (CO)

QUESTIONÁRIO DE SATISFAÇÃO (entrevista a ser efetuada por especialistas de Psicologia, devidamente preparadas e credenciadas com a disciplina de Avaliação Psicológica)

- Etapa 6 - Avaliação de resultados com “feedback” aos rastreantes. A classificação dos indivíduos será feita de acordo com a lesão mais avançada identificada;
- Etapa 7 - Apresentação de resultados

A estimação da amostra é de 528 adultos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 50 e os 74 anos, residentes na Região Autónoma da Madeira.

2 - QUESTIONÁRIO DE EXCLUSÃO

	S	N
1. Tem história familiar de CCR hereditário (PAF, HNPCC)?		
2. Tem história de pelo menos 3 familiares com cancro associado ao NHPCC (CCR, endométrio, intest. delgado, urotélio)? Pelo menos um familiar de 1º grau em relação aos outros dois; pelo menos duas gerações sucessivas afectadas; pelo menos um cancro diagnosticado antes dos 50 anos; cancros com confirmação histológica		
3. Tem história de qualquer cancro visceral coexistente?		
4. Tem história de doença inflamatória intestinal?		
5. Teve ressecção cólica anterior?		
6. Fez sigmoidoscopia, retosigmoidoscopia, colonoscopia, clister opaco nos dez anos anteriores?		
7. Teve alteração do hábito intestinal no mês precedente?		
8. Teve início de dor abdominal no mês precedente, que se mantém?		
9. Teve hemorragia digestiva no mês precedente? (hematemeses, melenas, hematoquézia, retorragias)		
10. Tem anemia ferropénica?		
11. Teve pesquisa positiva de sangue oculto nas fezes nos 6 meses precedentes?		
12. Recusa participar na investigação?		
13. Tem más condições físicas para se submeter aos exames?		

Nota – Qualquer sim é eliminatório

3 - CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____, aceito realizar o conjunto de avaliações que me foram explicadas no domínio do Projecto de Investigação sobre rastreio do cancro colorrectal(CCR) , sem qualquer compensação pecuniária para deslocações, faltas ao serviço ou taxas moderadoras.

Foi-me explicado que tenho o direito de retirar-me dos testes e das avaliações, a qualquer momento, e sem qualquer penalização. Compreendo, também, que tenho a liberdade de formular perguntas que possam surgir e que estas serão respondidas de maneira satisfatória.

Se achar que fui lesado em virtude dos exames efectuados, compreendo que possa contactar o Investigador Responsável para esclarecer as minhas preocupações.

Está salvaguardado o meu direito à privacidade.

Li, compreendo e aceito os termos e as condições acima referidos e ofereço-me como voluntário para participar no projecto de investigação intitulado RASTREIO DO CANCRO COLORRETAL – UTILIZAÇÃO CONJUGADA DA COLONOSCOPIA VIRTUAL E DA DETERMINAÇÃO DO DNA HUMANO MUTADO NAS FEZES.

O presente documento será assinado em duas vias, uma para o Investigador Responsável e a outra para o Participante.

_____, ____/____/____

Nome do participante: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura do participante: _____

Assinatura da testemunha: _____

O Investigador Responsável, _____

(Celso Almeida e Silva)

4 - INSTRUÇÕES PARA COLHEITA DE FEZES E SANGUE

Em recipiente bem lavado e seco (exemplo: bacio ou bacia), evacuar sem misturar com urina. Das fezes depositadas retirar, com colher de café, lavada e seca, porção de fezes (tamanho aproximado de uma noz) para pequeno contentor de plástico (fornecido pelo laboratório).

Entregar no mais curto espaço de tempo no local combinado, para que a amostra seja refrigerada no laboratório até à realização das análises.

Deverá apresentar-se em jejum.

5 - INSTRUÇÕES PARA A PREPARAÇÃO CÓLICA

Nota Prévia: A sua atitude é muito importante para o êxito dos exames que vai realizar. Colabore com o médico e técnicos que o irão atender, seguindo as suas instruções. Ambos podem esclarecer as suas dúvidas. Se tem qualquer doença renal deve referi-la imediatamente ao investigador responsável ou ao médico que estiver a atendê-lo/a.

A realização destes exames necessita de uma rigorosa limpeza intestinal. Os exames exigem que o seu intestino esteja o mais limpo possível, pelo que deve seguir atentamente as instruções de preparação. Uma limpeza deficiente do intestino pode obrigar à repetição do exame. Por favor, siga as instruções abaixo discriminadas.

PREPARAÇÃO CÓLICA

INSTRUÇÕES PARA INDIVÍDUO NORMAL

Nos 3º e 2º dias anteriores ao dia dos exames:

Pequeno almoço:

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

Torradas com compota (tipo geleia, sem gomos de frutos e sem cascas), biscoitos secos

Almoço e jantar:

Sopas brancas (batata, cenoura, arroz e massa), caldos de carne

Carnes ou peixes magros, cozidos ou grelhados (galinha, vitela, fiambre, pescada, etc.)

Arroz, puré de batata, ovo cozido

Pão branco, biscoitos secos, queijo fresco, iogurte

NÃO COMER FRUTA

Na véspera do exame, DIETA TOTALMENTE LÍQUIDA

9.00 horas – Pequeno almoço

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

12.00 horas – Almoço

Caldos de carne coados (água do caldo) + gelatina de ananás

Tomar 2 comprimidos de DULCOLAX (Bisacodil 5mg)

15.00 horas – **Tomar uma dose de CITRAFLEET (Phosphosoda 45ml)**

(num copo grande, deite o conteúdo do Fleet e complete-o com água e beba a totalidade). De seguida, beber dois litros de água ou chá

18.00 horas – Jantar

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

Caldos de carne coados (água do caldo) + gelatina de ananás

Tomar 1 embalagem de EZ CAT (não diluir)

19:00 horas – **Beber a 2ª dose de CITRAFLEET.** De seguida, beber mais dois litros de água ou chá

21:00 horas – Tomar 50 ml de gastrografina (ou telebrix gastro)

PODE BEBER ÁGUA E CHÁ ATÉ 7 HORAS ANTES DOS EXAMES. A PARTIR DAÍ NÃO DEVE INGERIR QUALQUER ALIMENTO OU LÍQUIDO

PREPARAÇÃO CÓLICA

INSTRUÇÕES PARA INDIVÍDUO COM INSUFICIÊNCIA RENAL LIGEIRA A MODERADA

Nos 3º e 2º dias anteriores ao dia dos exames:

Pequeno almoço:

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

Torradas com compota (tipo geleia, sem gomos de frutos e sem cascas), biscoitos secos

Almoço e jantar:

Sopas brancas (batata, cenoura, arroz e massa), caldos de carne

Carnes ou peixes magros, cozidos ou grelhados (galinha, vitela, fiambre, pescada, etc.)

Arroz, puré de batata, ovo cozido

Pão branco, biscoitos secos, queijo fresco, iogurte

NÃO COMER FRUTA

Na véspera do exame, DIETA TOTALMENTE LÍQUIDA

9.00 horas – Pequeno almoço

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

12.00 horas – Almoço

Caldos de carne coados (água do caldo) + gelatina de ananás

Tomar 2 comprimidos de DULCOLAX (Bisacodil 5mg)

15.00 horas – **Tomar a dose de CITRATO DE MAGNÉSIO fornecida.** De seguida, beber dois litros de água ou chá

18.00 horas – Jantar

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

Caldos de carne coados (água do caldo) + gelatina de ananás

Tomar 1 embalagem de EZ CAT (não diluir)

19:00 horas –Tomar a 2ª dose de **CITRATO DE MAGNÉSIO**. De seguida, beber dois litros de água ou chá

19:30 horas – **Tomar 2 comprimidos de DULCOLAX (bisacodil 5 mg)**

21:00 horas – Tomar 50 ml de gastrografina (ou telebrix gastro)

PODE BEBER ÁGUA E CHÁ ATÉ 7 HORAS ANTES DOS EXAMES. A PARTIR DAÍ NÃO DEVE INGERIR QUALQUER ALIMENTO OU LÍQUIDO

PREPARAÇÃO CÓLICA

INSTRUÇÕES PARA INDIVÍDUO COM INSUFICIÊNCIA RENAL GRAVE

Nos 3º e 2º dias anteriores ao dia dos exames:

Pequeno almoço:

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

Torradas com compota (tipo geleia, sem gomos de frutos e sem cascas), biscoitos secos

Almoço e jantar:

Sopas brancas (batata, cenoura, arroz e massa), caldos de carne

Carnes ou peixes magros, cozidos ou grelhados (galinha, vitela, fiambre, pescada, etc.)

Arroz, puré de batata, ovo cozido

Pão branco, biscoitos secos, queijo fresco, iogurte

NÃO COMER FRUTA

Na véspera do exame, DIETA TOTALMENTE LÍQUIDA

9.00 horas – Pequeno almoço

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

12.00 horas – Almoço

Caldos de carne coados (água do caldo) + gelatina de ananás

Tomar 2 comprimidos de DULCOLAX (Bisacodil 5mg)

15.00 horas – **Tomar 1 litro de KLEAN-PREP** (diluir 1 saqueta num 1 litro de água morna e tomar 250ml de 10 em 10 minutos)

17.00 horas – Jantar

Infusão de tília, erva cidreira ou qualquer tipo de chá

Sopas brancas (batata, cenoura, arroz e massa), caldos de carne

Tomar 1 embalagem de EZ CAT (não diluir)

18:00 horas – **Tomar 1 litro de KLEAN-PREP** (diluir 1 saqueta num 1 litro de água morna e tomar 250ml de 10 em 10 minutos)

19:00 horas – **Tomar 2 comprimidos de DULCOLAX (bisacodil 5 mg)**

Tomar 1 litro de KLEAN-PREP (diluir 1 saqueta num 1 litro de água morna e tomar 250ml de 10 em 10 minutos)

21:00 horas – Tomar 50 ml de gastrografina (ou telebrix gastro)

PODE BEBER ÁGUA E CHÁ ATÉ 7 HORAS ANTES DOS EXAMES. A PARTIR DAÍ NÃO DEVE INGERIR QUALQUER ALIMENTO OU LÍQUIDO

MATERIAL A FORNECER AO PARTICIPANTE

- 1 embalagem de EZ CAT
- 2 a 4 comprimidos de DULCOLAX (Bisacodil 5mg)
- 2 embalagens de CITRAFLEET (45ml de Phosphosoda)
(ou CITRATO DE MAGNÉSIO ou KLEAN-PREP)
- 50 ml de GASTROGRAFINA (ou TELEBRIX GASTRO)

PRODUTOS PARA A PREPARAÇÃO INTestinal

1 embalagem de EZ CAT = 225 ml de sulfato de bário a 4,6% (p/p) – 49,2 mg/ml

2 a 4 comprimidos de DULCOLAX (bisacodil 5mg)

Preparado farmacológico de CITRATO DE MAGNÉSIO

2 embalagens de CITRAFLEET (45 ml de Phosphosoda)

50 ml de GASTROGRAFINA (ou Telebrix gastro)

3 embalagens de KLEAN-PREP (Angelini) (polietilenoglicol –PEG)

Cada saqueta de polietilenoglicol contém (em pó):

Polietilenoglicol 3350	59,0000 g
Sulfato de Sódio Anidro	5.6850 g
Bicarbonato de Sódio	1,6850 g
Cloreto de Sódio	1,4650 g
Cloreto de Potássio	0,7425 g
Aspartame	0,0494 g
Aroma de baunilha	0,3291 g

O conteúdo de cada saqueta é preparado com um litro de água norma.

6 - CRITÉRIOS PARA CO ADEQUADA

Exame realizado por especialista

Intestino grosso devidamente preparado

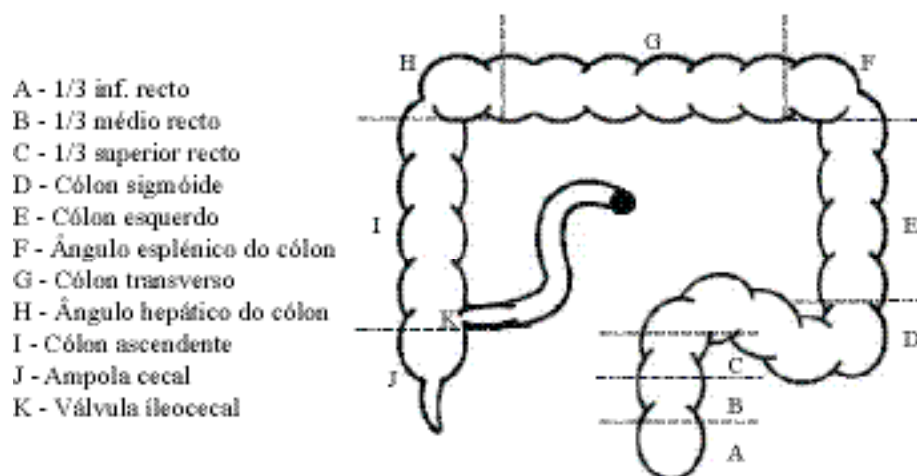
A válvula ileocecal deve ser sempre visualizada e pelo menos 90% da mucosa colorretal observada

Deve ser feita colheita de todos os pólipos observados, os quais devem ser todos enviados para exame histológico

Exame histológico realizado por especialista

Classificação dos indivíduos de acordo com a lesão mais avançada identificada

Divisão do intestino grosso para referência das lesões colhidas por CO (11 regiões):



7 - DIAGNÓSTICOS DE HISTOLOGIA

Formações poliposas do Intestino Grosso

A - Lesões epiteliais:

Harmartomas

1. Pólipo de Peutz-Jeghers
2. Doença de Cowden
3. Pólipos juvenis

Pólipos Hiperplásicos (sem displasia)

4. Pólipo Hiperplásico séssil
5. Pólipo Hiperplásico pediculado

Pólipos Hiperplásicos serreados

6. Pólipo Hiperplásico séssil serreado
7. Pólipo Hiperplásico pediculado serreado

Pólipos Neoplásicos - Adenomas (com displasia)

8. Adenoma tubular séssil com displasia de baixo grau
9. Adenoma tubular séssil com displasia de alto grau
10. Adenoma tubular pediculado com displasia de baixo grau
11. Adenoma tubular pediculado com displasia de alto grau
12. Adenoma viloso séssil com displasia de baixo grau
13. Adenoma viloso séssil com displasia de alto grau
14. Adenoma viloso pediculado com displasia de baixo grau
15. Adenoma viloso pediculado com displasia de alto grau
16. Adenoma tubulo-viloso séssil com displasia de baixo grau
17. Adenoma tubulo-viloso séssil com displasia de alto grau

18. Adenoma tubulo-viloso pediculado com displasia de baixo grau

19. Adenoma tubulo-viloso pediculado com displasia de alto grau

Adenocarcinomas

20. Adenocarcinoma bem diferenciado

Adenocarcinomas produtores de muco

21. Adenocarcinoma muco-celular

22. Adenocarcinoma mucoso

23. Adenocarcinoma com estroma embebido em muco

24. Adenocarcinoma hepatoide

25. Adenocarcinoma com metaplasia malpighiana

26. Adenocarcinoma com diferenciação trofoblástica

Carcinomas

27. Carcinoma basaloide (cloacogénico)

28. Carcinoma de células claras

29. Carcinoide

B - Outras lesões

I - Lesões conjuntivas e vasculares

30. Leiomioma

31. Leiomiossarcoma

32. Lipoma

33. Lipossarcoma

34. Schwanoma benigno

35. Schwanoma maligno

36. Fibroma

- 37. Fibrossarcoma
- 38. Hiperplasia linfóide
- 39. Linfoma
- 40. Neuroma
- 41. Neurossarcoma
- 42. Ganglioneuroma
- 43. Tumores endócrinos
- 44. Ganglioneuromatose
- 45. Linfangioleiomiomatose
- 46. Angiomiolipoma
- 47. Melanoma
- 48. Sarcoma de Kaposi
- 49. Rabdomioma
- 50. Rabdomiossarcoma
- 51. Tumor metastático
- 52. Quisto dermóide
- 53. Ectasia vascular
- 54. Angioma
- 55. Angiossarcoma
- 56. Hemangiopericitoma benigno
- 57. Hemangiopericitoma maligno

II - Lesões Parasitárias

- 58. Lesões parasitárias

III - Lesões Inflamatórias

- 59. Doença de Crohn

60. Colite ulcerosa

61. Colite e rectite

IV - Lesões Degenerativas

62. Diverticulose

63. Epitélio gástrico heterotópico retal

64. Tecido glandular salivar retal

65. Melanosis coli

66. Endometriose

67. Amiloidose

68. Malakoplakia

69. Alterações pelas radiações

70. Granuloma do Bário

71. Pneumatose

72. Colite quística profunda

8 - ESCALA DE SATISFAÇÃO COM OS EXAMES DE COLONOSCOPIAS (ESEC)

INSTRUÇÕES

Com os diferentes itens desta escala, não se pretende apurar se a metodologia deste exame médico está certo/errado. Pretendemos apenas que nos diga, o mais objectivamente possível, qual o seu nível de satisfação para com cada um destes exames médicos.

Para cada item da escala existe uma ponderação de 1 a 4, com a seguinte correspondência:

- 1 – Discordo muito;
- 2 – Discordo;
- 3 – Concordo;
- 4 – Concordo muito.

Assinale com um **X** na quadrícula a que melhor se ajusta ao seu caso (só poderá assinalar apenas uma quadrícula por pergunta)

	1	2	3	4
1. Foi fácil fazer a preparação para estes exames	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Não senti qualquer efeito da medicação usada para me preparar para estes exames	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Senti-me bem enquanto durou o exame de Colonoscopia Ótica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Estava nervoso/a quando estava à espera que me chamassem para estes exames	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Não me custou fazer o exame de Colonoscopia Ótica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Compreendi bem as instruções que me foram dadas para me preparar para este exame	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Não me custou fazer o exame de Colonoscopia Virtual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de Colonoscopia Virtual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Acho que o exame de Colonoscopia Ótica é eficaz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Prefiro fazer o exame de Colonoscopia Ótica do que o de Colonoscopia Virtual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Enquanto estive a fazer o exame de Colonoscopia Virtual tive pensamentos negativos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- | | | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 12. As instruções que o médico me deu enquanto fazia os exames foram importantes para me relaxar | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 13. Acho que o exame de Colonoscopia Virtual é eficaz | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 14. Tive receio quando me estavam a fazer o exame de Colonoscopia Ótica | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 15. O exame de Colonoscopia Virtual não é doloroso de fazer | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 16. Não vinha descontraindo quando vim para estes exames | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 17. Ter ar nos intestinos não me incomodou na Colonoscopia Ótica | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 18. Senti-me bem enquanto durou o exame de Colonoscopia Virtual | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 19. O exame de Colonoscopia Ótica não é doloroso de fazer | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 20. Tive receio quando me estavam a fazer o exame de Colonoscopia Virtual | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 21. Senti-me ansioso enquanto estava a fazer o exame de Colonoscopia Ótica | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 22. Sabia o suficiente sobre os exames antes de os realizar | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 23. A informação sobre o que nos vão fazer durante os exames é importante | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 24. Estava indisposto quando fiz os exames | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 25. Enquanto estive a fazer o exame de Colonoscopia Ótica tive pensamentos negativos | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 26. Pensei em muitas coisas enquanto esperava para realizar estes exames | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 27. Ter ar nos intestinos não me incomodou na Colonoscopia Virtual | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

9 - ESTATUTO SÓCIOECONÓMICO (MÉTODO GRAFFAR)

1. Profissão

- 1.1 Directores de bancos, directores técnicos de empresas, licenciados profissionais com títulos universitários e militares de alta patente
- 1.2 Chefes de secções administrativas ou de negócios empresariais, subdirectores, peritos e comerciantes.
- 1.3 Ajudantes técnicos, desenhadores, caixeiros, contra-mestres, oficiais de primeira, encarregados capatazes, e mestres-de-obra.
- 1.4 Operários especializados com ensino primário completo (ex. motoristas, polícias, cozinheiros, etc)
- 1.5 Trabalhadores manuais ou operários não especializados (ex.: ajudantes de cozinha, mulheres de limpeza, etc).

2. Nível de instrução

- 2.1 Ensino universitário ou equivalente (12 ou mais anos de estudo)
- 2.2 Ensino médio ou técnico superior (10 a 11 anos de estudo). Por exemplo, técnicos e peritos.
- 2.3 Ensino médio ou técnico inferior (8 a 9 anos de estudo).
- 2.4 Ensino primário completo (6 anos de estudo).
- 2.5 Ensino primário incompleto

3. Fontes de rendimento familiar

- 3.1 A fonte principal é fortuna herdada ou adquirida
- 3.2 Os rendimentos consistem em lucros de empresas, altos honorários, lugares bem remunerados, etc
- 3.3 Os rendimentos correspondem a um vencimento mensal fixo, tipo funcionário
- 3.4 Os rendimentos resultam de salários, ou seja remuneração por semana, por horas ou à tarefa
- 3.5 A família é sustentada pela beneficência. Não incluir neste grupo as pensões de desemprego ou de incapacidade

4. Conforto do alojamento

- 4.1 Casas ou andares luxuosos, muito grandes, oferecendo aos seus moderadores o máximo

conforto.

4.2 Casas ou andares que, sem serem tão luxuosos como os da categoria precedente, mas espaços e confortáveis.

4.3 Casas ou andares modestos, bem construídos e em bom estado de conservação, iluminadas e arejadas

4.4 Categoria intermédia entre 3 e 5.

4.5 Alojamentos impróprios para uma vida decente, sem conforto, ventilação, iluminação ou superlotado

5.Aspecto do bairro onde habita

5.1 Bairro residencial elegante, onde o valor do terreno ou os alugueres são elevados.

5.2 Bairro residencial bom, de ruas largas com casas confortáveis e bem conservadas.

5.3 Ruas comerciais ou estreitas e antigas, com casas de aspecto geral menos confortável.

5.4 Bairro social, populoso, mal arejado ou bairro em que o valor do terreno é baixo

5.5 Bairros de lata

Critérios de cotação do estatuto sócio-económico

Nível	Classificação	Pontos
1	superior	5 a 9
2	médio superior	10 a 13
3	média	14 a 17
4	média baixa	18 a 21
5	inferior	22 a 25

Cotação Final

Pontuação

Profissão	
Nível de instrução	
Fontes de rendimento familiar	
Conforto do alojamento	
Aspecto do bairro onde habita	
Total	

10 -TABELA SUPLEMENTAR L-DNA1

Tabela 1 - Positividade do marcador molecular L-DNA de acordo com as características da amostra e das lesões mais avançadas (CV, indivíduos com apenas 1 lesão)

		L-DNA		χ^2 /teste t	valor-p	OR	IC a 95%	RL ^{a)} B	valor-p
		- n=113	+ n=19						
Sexo	Masc/Fem (% Masc)	54/59 (47,8%)	9/10 (47,3%)	0,001	1	1,017	0,384-2,691	-0,726	0,041
Idade	Média anos (d.p.)	58,9 (6,1)	56,1 (4,6)	1,926	0,056			0,033	0,280
Presença de lesões	Com lesões (%) Sem lesões (%)	53 (86,9%) 60 (84,5%)	8 (13,1%) 11 (15,5%)	0,151	0,806	0,823	0,308-2,200		
Lesão mais avançada	<i>Dimensão</i>								
	1-5mm	36 (83,7%)	7 (16,3%)	1,524	0,467				
	6-9mm	11 (91,7%)	1 (8,3%)						
	>9mm,maligna	6 (100%)	0 (0%)						
	Outras								
	<i>Região</i>								
	Recto	15 (93,8%)	1 (6,3%)	4,433	0,489				
	Cólon sigmóide	15 (93,8%)	1 (6,3%)						
	Cólon descendente	7 (77,8%)	2 (22,2%)						
	Cólon transverse	8 (72,7%)	3 (27,3%)						
	Cólon ascendente	5 (83,3%)	1 (16,7%)						
	Cego	3 (100%)	0 (0%)						
	<i>Caraterização histológica^{b)}</i>								
	Adenocarcinoma bem diferenciado	1 (100%)	0 (0%)	7,256	0,123				
	Adenoma tubular sésil com displasia alto grau	9 (90%)	1 (10%)						
	Adenoma tubular sésil com displasia baixo grau	20 (95,2%)	1 (4,8%)						
	Pólipo hiperplásico sésil	15 (88,2%)	2 (11,8%)						
	Pólipo hiperplásico sésil serreado	4 (57,1%)	3 (42,9%)						
	Adenoma	29 (93,5%)	2 (6,5%)	1,391	0,239	3,723	0,663-30,140		
	Pólipo	19 (79,2%)	5 (20,8%)						

Os valores-p<0,05 encontram-se destacados a negrito

a) Regressão logística, variável "Presença de lesões", método B-step (Wald), com L-DNA, Sexo e Idade

b) Na caraterização histológica, não foram consideradas classes com n<3.

11 - TABELA SUPLEMENTAR L-DNA2

Tabela 2 - Positividade do marcador molecular L-DNA de acordo com as características da amostra e das lesões mais avançadas (Colonoscopia Virtual)

		L-DNA		χ^2 /teste t	valor-p	OR	IC a 95%	RL ^{a)}	
		- n=161	+ n=31					B	valor-p
Sexo	Masc/Fem (% Masc)	69/95 (42,3%)	17/14 (54,8%)	1,643	0,238	0,605	0,279-1,309	-0,376	0,197
Idade	Média anos (d.p.)	59,5 (6,1)	58,3 (6,9)	1,034	0,303			0,025	0,290
Presença de lesões	Com lesões (%)	86 (81,0%)	20 (19,0%)	1,597	0,241	1,668	0,752-3,703		
	Sem lesões (%)	78 (87,6%)	11 (12,4%)						
Lesão mais avançada	Dimensão			0,247	0,884				
	1-5mm	44 (78,6%)	12 (21,4%)						
	6-9mm	21 (80,8%)	5 (19,8%)						
	>9mm,maligna	20 (83,3%)	4 (16,7%)						
	Região ^{b)}			1,999	0,849				
	Recto	24 (82,8%)	5 (17,2%)						
	Cólon sigmóide	31 (84,2%)	6 (15,8%)						
	Cólon descendente	6 (75,0%)	2 (25,0%)						
	Cólon transverso	12 (75,0%)	4 (25,0%)						
	Cólon ascendente	6 (66,7%)	3 (33,3%)						
	Cego	6 (85,7%)	1 (14,3%)						

a) Regressão logística, variável "Presença de lesões", método B-step (Wald), com L-DNA, Sexo e Idade

b) Na caracterização histológica, não foram consideradas classes com n<3.